

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 26. rujna 2017.

Marina Grubišić

853/BPI

**Proizvodnja bioetanola na blago  
kiselinskim hidrolizatima pšenične  
slame dobivenim pomoću sumporne  
kiseline u različitim mjerilima**

*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 dr. sc. Božidara Šanteka, redovitog profesora u trajnom zvanju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr. sc. Maria Novaka, višeg asistenta.*

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

*Ovom prilikom zahvalila bi svom mentoru prof. dr. sc. Božidaru Šanteku na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici za izradu ovoga rada, kao i asistentima dr. sc. Mariu Novaku, dr. sc. Antoniji Trontel i mag. ing. bioproc. Nenadu Marđetku na strpljenju, brojnim savjetima, trudu i uloženom vremenu tijekom izrade ovoga rada. Također se zahvaljujem svim drugim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva koji su pomagali u izradi eksperimenata.*

*Posebno se želim zahvaliti svojoj obitelji i svim prijateljima na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog školovanja. Uz njihove riječi podrške bilo mi je mnogo lakše.*

## 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

### PROIZVODNJA BIOETANOLA NA BLAGO KISELINSKIM HIDROLIZATIMA PŠENIČNE SLAME DOBIVENIM POMOĆU SUMPORNE KISELINE U RAZLIČITIM MJERILIMA

*Marina Grubišić, 853/BPI*

#### Sažetak:

Kako bi se ispitao utjecaj temperature na uspješnost procesa predobrade pšenične slame s 0,5 % sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru, procesi predobrade provedeni su na temperaturama od 150 °C, 160 °C, 170 °C, 180 °C, 190 °C i 200 °C uz konstantno vrijeme zadržavanja ( $t_z$ ) od 5 minuta. Najviša koncentracija ksiloze ( $13,0154 \text{ g L}^{-1}$ ) ostvarena je pri temperaturi od 160 °C, a glukoze ( $4,7257 \text{ g L}^{-1}$ ) na temperaturi od 200 °C. Kako bi se ispitao učinak vremena zadržavanja na uspješnost procesa, primjenjena su vremena zadržavanja od 1 i 10 minuta na tri temperature: 160, 180 i 200 °C. Najveći maseni udio glukana uočen je predobradom na 200 °C i  $t_z = 10 \text{ min}$  i iznosi 30,42 %, a ksilana na temperaturi od 160 °C i  $t_z = 5 \text{ min}$  i iznosi 68,64 %. Analizom sastava hidrolizata odabrano je 5 različitih hidrolizata za usporedbu rasta i proizvodnje etanola u Erlenmeyer tikvicama pomoću dva soja kvasca *S. cerevisiae*: (1) divlji soj i soj Y9. Najveća uspješnost procesa proizvodnje etanola zabilježena je kod uzgoja soja Y9 na hidrolizatu dobivenom predobradom na temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 10 minuta pri čemu je ostvarena produktivnost od  $0,045 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  i efikasnost od 43,25 %. Na istom hidrolizatu proveden je uzgoj kvasca soj Y9 i u poluindustrijskom mjerilu tj. horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru pri čemu je dobivena produktivnost od  $0,143 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  i efikasnost od 64,01 %.

**Ključne riječi:** etanol, pšenična slama, kiselinska predobrada, *Saccharomyces cerevisiae*, različita mjerila

**Rad sadrži:** 78 stranica, 34 slika, 10 tablica, 80 literaturnih navoda, 1 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** red.prof.dr.sc. Božidar Šantek

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Mario Novak

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. Blaženka Kos

2. Prof. dr. sc. Božidar Šantek

3. Prof. dr. sc. Tonči Rezić

4. Doc. Dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

**Datum obrane:** 26. rujan 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemistry engineering  
Laboratory for Biochemistry engineering,  
industrial microbiology and beer and malt technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### PRODUCTION OF BIOETHANOL ON THE MILD ACID WHEAT STRAW HYDROLYSATES OBTAINED BY SULFURIC ACID IN VARIOUS SCALES

*Marina Grubišić, 853/BPI*

#### Abstract:

In order to investigate the effect of temperature on the efficacy of wheat straw pretreatment with 0,5 % sulfuric acid in high-pressure reactor, processes were conducted on different temperatures: 150 °C, 160 °C, 170 °C, 180 °C, 190 °C and 200 °C, with a constant residence time of 5 minutes. The highest xylose concentration (13,0154 g L<sup>-1</sup>) was achieved in pretreatment carried out at temperature of 160 °C and the highest glucose concentration (4,7257 g L<sup>-1</sup>) at temperature of 200 °C respectively. To investigate the effect of residence time on the efficacy of process, residence time of 1 and 10 minutes were also used at three temperatures: 160, 180 and 200 °C. The highest mass fraction of xylan (68,64 %) was achieved at temperature of 160 °C and residence time of 5 minutes. The highest mass fraction of glucan was 30,42 %, and it was observed at temperature of 200 °C and residence time of 10 minutes. Based on the composition of acid hydrolysates of wheat straw, five hydrolysates were selected for further research with two strains of *S. cerevisiae*: wild-type and type Y9. The most successful ethanol production process was observed by yeast strain Y9 on the broth containing wheat straw hydrolysates obtained during pretreatment at 180 °C and residence time of 10 minutes. In this bioprocess productivity of 0,045 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> together with efficiency of 43,25 % were observed. During anaerobic cultivation of *S. cerevisiae* strain Y9 in the horizontal rotating tubular bioreactor on the same hydrolysate bioprocess productivity reached value of 0,143 g L<sup>-1</sup> and efficiency of 64,01 % respectively.

**Keywords:** ethanol, wheat straw, acid pretreatment, *Saccharomyces cerevisiae*, different scales

**Thesis contains:** 78 pages, 34 figures, 10 tables, 80 references, 1 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:** Šantek Božidar, prof. dr.sc.

**Technical support and assistance:** dr. sc. Mario Novak

#### Reviewers:

1. Prof. dr. sc. Blaženka Kos
2. Prof. dr. sc. Božidar Šantek
3. Prof. dr. sc. Tonči Rezić
4. Doc. Dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

**Thesis defended:** 26. September 2017.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Lignocelulozne sirovine .....	3
2.1.1. Građa lignocelulozne sirovine .....	3
2.1.1.1. Celuloza.....	4
2.1.1.2. Hemiceluloza.....	5
2.1.1.3. Lignin .....	6
2.1.2. Predobrada lignocelulozne sirovine.....	7
2.1.2.1. Fizikalna predobrada .....	7
2.1.2.2. Kemijske metode .....	8
2.1.2.3. Fizikalno- kemijske metode .....	9
2.1.2.4. Biološke metode .....	10
2.1.3. Inhibitori koji nastaju tijekom predobrade .....	10
2.2. Biogoriva .....	12
2.2.1. Biogoriva prve generacije.....	12
2.2.2. Biogoriva druge generacije.....	13
2.2.3. Biogoriva treće generacije .....	14
2.2.4. Bioetanol .....	14
2.2.4.1. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina.....	16
2.2.4.2. Radni mikroorganizam .....	17
2.2.4.2.1. Kvasac .....	17
2.2.4.2.2. Bakterije .....	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	19
3.1. Materijali .....	19
3.1.1. Sirovina .....	19
3.1.2. Radni mikroorganizam .....	19
3.1.3. Kemikalije .....	20
3.1.4. Hranjive podloge za održavanje i uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> .....	20
3.1.4.1. Hranjiva podloga za održavanje čiste kulture.....	20
3.1.4.2. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma.....	20
3.1.4.3. Kontrolne hranjive podloge za uzgoj u Erlenmeyer tikvicama .....	21
3.1.4.4. Hranjive podloge s lignoceluloznim hidrolizatima .....	21
3.1.4.5. Hranjiva podloga za uzgoj u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору .....	21

3.1.5.	Oprema i aparatura .....	22
3.1.5.1.	Mlin čekičar.....	22
3.1.5.2.	HPLC.....	22
3.1.5.3.	Visokotlačni reaktor za termičku obradu lignoceluloznih sirovina.....	23
3.1.5.4.	Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB).....	24
3.1.5.5.	Ostali uređaji .....	25
3.2.	METODE .....	26
3.2.1.	Predobrada lignocelulozne sirovine.....	26
3.2.2.	Uzgoj inokuluma .....	26
3.2.3.	Uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> i nadzor procesa alkoholnog vrenja .....	26
3.2.3.1.	Proces alkoholne fermentacije u tikvicama .....	26
3.2.3.2.	Proces alkoholne fermentacije u reaktoru .....	27
3.2.3.3.	Nadzor procesa alkoholnog vrenja .....	27
3.2.4.	Analitičke metode.....	28
3.2.4.1.	Određivanje suhe tvari u lignoceluloznoj sirovini.....	28
3.2.4.2.	Kiselinska hidroliza lignocelulozne sirovine.....	28
3.2.4.3.	Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini.....	29
3.2.4.4.	Udjel lignina topljivog u kiselini (LTK).....	29
3.2.4.5.	Određivanje furana spektrofotometrijski.....	29
3.2.4.6.	Određivanje optičke gustoće uzoraka hranjive podloge.....	30
3.2.4.7.	Određivanje ukupnog broja živih stanica kvasca .....	30
3.2.4.8.	Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC).....	30
3.2.4.8.1.	Priprema uzorka nakon dvostupanjske kis. hidrolize za analizu HPLC metodom.....	31
3.2.4.8.2.	Priprema uzoraka tekuće faze za analizu HPLC metodom .....	31
3.2.5.	Izračunavanje udjela strukturnih ugljikohidrata .....	32
3.2.6.	Izračunavanje iskorištenja glukana, ksilana i ukupnog lignina u lignoceluloznoj sirovini	32
3.2.7.	Izračunavanje pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje etanola.....	33
3.2.7.1.	Potrošnja supstrata ( $\Delta S$ ).....	33
3.2.7.2.	Prinos produkta ( $Y_p$ ).....	33
3.2.7.3.	Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ( $Y_p/s$ ).....	33
3.2.7.4.	Produktivnost ( $Pr$ ) .....	33
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	34
4.1.	Ispitivanje utjecaja temperature na uspješnosti kiselinske predobrade pšenične slame sumpornom kiselinom .....	35



4.2. Ispitivanje utjecaja vremena zadržavanja ( $t_z$ ) na uspješnost procesa predobrade lignocelulozne sirovine.....	39
4.3. Anaerobni uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> i proizvodnja etanola na hidrolizatima dobivenim kiselinskom predobradom pšenične slame u Erlenmeyerovim tikvicama.....	45
4.3.1. Anaerobni uzgoj divljeg soja kvasca <i>S. cerevisiae</i> u Erlenmeyer tikvici .....	46
4.3.2. Anaerobni uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> soj Y9 u Erlenmeyer tikvici na kontrolnim podlogama .....	50
4.3.3. Anaerobni uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> soj Y9 u Erlenmeyer tikvicama na hidrolizatima pšenične slame.....	54
4.3.3.1. Anaerobni uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> soj Y9 na hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom s 0,5% sumpornom kiselinom pri 160 °C kroz 10 minuta.....	55
4.3.3.2. Anaerobni uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> soj Y9 na hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom s 0,5% sumpornom kiselinom pri 180 °C kroz 10 minuta.....	57
4.3.3.3. Anaerobni uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> soj Y9 na hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom s 0,5% sumpornom kiselinom pri 200 °C kroz 10 minuta.....	59
4.4. Anaerobni uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> soj Y9 na hidrolizatu pšenične slame u horizontalnom rotirajućem cijevnom reaktoru .....	62
5. ZAKLJUČCI .....	66
6. LITERATURA.....	68
7. PRILOZI.....	76
7.1. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije ugljikohidrata i proizvoda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) .....	76
7.2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije furana tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) .....	78

**UVOD**

## 1. UVOD

Usljedi ubrzanog razvoja svjetskog gospodarstva, povećanja industrijalizacije i naglog porasta broja stanovnika kroz posljednjih nekoliko desetljeća, globalna potražnja za energijom je u stalnom porastu. Osnovni izvori energije su neobnovljiva fosilna goriva koja pokrivaju 80 % svjetskih potreba za energijom (Koh i Ghazoul, 2008; Guo i sur., 2015). Osim što su neobnovljivi i ograničeni izvor energije, fosilna goriva uzrokuju brojne ekološke probleme. Izgaranjem fosilnih goriva u atmosferu se ispuštaju velike količine stakleničkih plinova, te je koncentracija atmosferskog CO<sub>2</sub> porasla s pre-industrijskih 280 mg L<sup>-1</sup> na 400 mg L<sup>-1</sup>, što uzrokuje nepovoljne klimatske promjene (Guo i sur., 2015). Iz zabrinutosti o mogućem nestanku fosilnih goriva, porastu cijene sirove nafte, energetske sigurnosti i sve bržeg globalnog zatopljenja, interes javnosti sve je više usmjeren prema obnovljivim izvorima energije kao što su biogoriva (Koh i Ghazoul, 2008, Guo i sur., 2015, Zhang i sur, 2016). Iz istog razloga vlade razvijenih država nastoje potaknuti proizvodnju i potrošnju obnovljivih izvora energije putem posebnih zakonskih regulativa i različitih subvencija. Transportni sektor Europske unije ovisan je o uvozu fosilnih goriva i na taj način veoma je osjetljiv na promjene na globalnom tržištu (Galbe i Zacchi, 2007). Stoga je Vijeće EU 6. travnja 2009. usvojilo direktivu 2009/28/EZ o promicanju upotrebe energije iz obnovljivih izvora, u kojoj se navodi kako je svaka država članica obavezna najmanje 20 % potreba za energijom do 2020. godine proizvesti iz obnovljivih izvora (ECA, 2016). Također se propisuje kako svaka država članica mora 10 % potrebne energije koja se koristi u prometnom sektoru proizvesti iz obnovljivih sirovina. Da bi se to ostvarilo nastoji se povećati proizvodnja električne energije i drugih oblika energije iz obnovljivih izvora, kao i povećanjem udjela biogoriva u motornim gorivima koji je 2014. godine u EU iznosio svega 5 % (ECA, 2016). U SAD-u postavljen je nacionalni plan koji predviđa da se biomasom pokrije 5 % ukupne industrijske potrebe za energijom, 20 % potrošnje motornih goriva i 25 % bioloških kemikalija i materijala do 2030. godine (Zhang i sur., 2015.). Održiva proizvodnja goriva i kemikalija trebala bi se bazirati na sirovinama kao što su poljoprivredna i šumska biomasa koje se ne natječu s proizvodnjom humane i stočne hrane (Van Dongen i sur., 2011). Upravo se iz tog razloga lignocelulozna biomasa istaknula kao moguća sirovina za održivu proizvodnju biogoriva i biokemikalija, budući da je najobilnija obnovljiva biomasa na Zemlji koja se uglavnom smatra otpadom (Isikgor i Becker, 2015). Među biogorivima se istaknuo bioetanol koji je vodeći kandidat za zamjenu goriva proizvedenog iz nafte, budući da se može miješati s benzinom i bez većih

modifikacija koristiti u većini motora (Morales i sur., 2015). No u komercijalnoj proizvodnji bioetanola koriste se škrobne i šećerne sirovine, te je zbog kompeticije s proizvodnjom hrane održivost takve proizvodnje upitna (Morales i sur., 2015; Isikgor i Becker, 2015). Da bi se lignocelulozna sirovina mogla koristiti kao supstrat za proizvodnju bioetanola nužna je njena predobrada kako bi joj se povećala poroznost i razgradljivost te reducirala celulozna kristaličnost (Zhang i sur., 2016; Mosier i sur., 2005). Jedan od najčešće korištenih i najviše obećavajućih predtretmana je onaj kiselinski. Sumporna kiselina testirana je na raznolikim lignoceluloznim materijalima, te predobrada ovom kiselinom rezultira degradacijom hemiceluloze i povećanom enzimskom razgradljivošću celuloze (Jönsson i Martin, 2016). Glavni šećer koji se oslobađa razgradnjom hemiceluloze je ksiloza, te kako bi se povećala isplativost procesa potrebno je koristiti mikroorganizme koji imaju sposobnost njenog metaboliziranja. Sve češće se koriste genetički modificirani sojevi kvasca *S. cerevisiae* (jedan od najčešće korištenih mikroorganizama za proizvodnju etanola; Ivančić-Šantek i sur., 2016) koji imaju sposobnost metaboliziranja ksiloze s ciljem maksimiziranja prinosa etanola (Helle i sur., 2003).

Svrha ovog rada bila je ispitati utjecaj temperature i vremena zadržavanja na uspješnost procesa predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru uz sumpornu kiselinu kao katalizator. Ispitivan je utjecaj različitih temperatura (150 °C-200 °C) i vremena zadržavanja (1-10 minuta). Analizom sastava dobivenih hidrolizata odabrani su oni za koje se smatralo da su najpovoljniji za proces proizvodnje etanola pomoću kvasca *S. cerevisiae*. Za proces proizvodnje etanola na dobivenim hidrolizatima korištena su dva soja kvasca: genetički modificiran soj Y9 i divlji soj. Anaerobni uzgoj najprije je proveden u tikvicama, a potom dodatno testiran u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB).

**TEORIJSKI DIO**

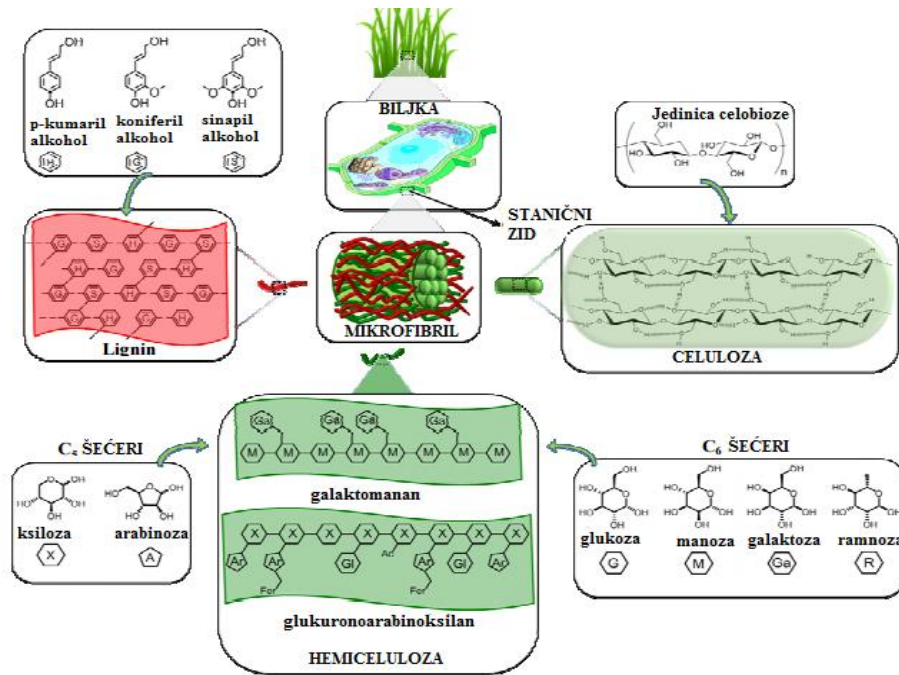
## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. Lignocelulozne sirovine**

Više od 95% kemikalija koje sadrže ugljik proizvedeno je iz fosilnih izvora (Rass-Hansen i sur., 2007). Umjesto fosilnih izvora kao obećavajuća alternativa za proizvodnju tih kemikalija istaknula se biomasa i njeni derivati. U tom pogledu lignocelulozna biomasa, kao najobilnija dostupna biomasa na svijetu i održivi izvor organskog ugljika od velike je važnosti (Isikgor i Becer, 2015). Lignoceluloza je osnovna strukturna komponenta drvenih biljaka, ali i nedrvenih biljaka kao što je trava i predstavlja jedan od glavnih obnovljivih izvora organskog materijala (Howard i sur., 2003). Velike količine lignocelulozne biomase koja se smatra otpadom zbrinjava se spaljivanjem unatoč njenom velikom potencijalu za primjenu u proizvodnji različitih proizvoda dodatne vrijednosti kao što su biogoriva, biokemikalije i biopolimeri (Howard i sur., 2003). Prednosti upotrebe lignoceluloznih materijala u odnosu na šećerne i škrobne sirovine je njihova niska cijena, laka dostupnost i široka raspostranjenost diljem svijeta (Zhang i sur., 2012; Isikgor i Becker, 2015). Unatoč svim prednostima, korištenje lignoceluloznih sirovina u komercijalnoj proizvodnji biogoriva je rijetko zbog njene složene strukture i otpornosti na enzimsku i kemijsku hidrolizu zahvaljujući njenim fizikalno-kemijskim svojstvima.

#### **2.1.1. Građa lignocelulozne sirovine**

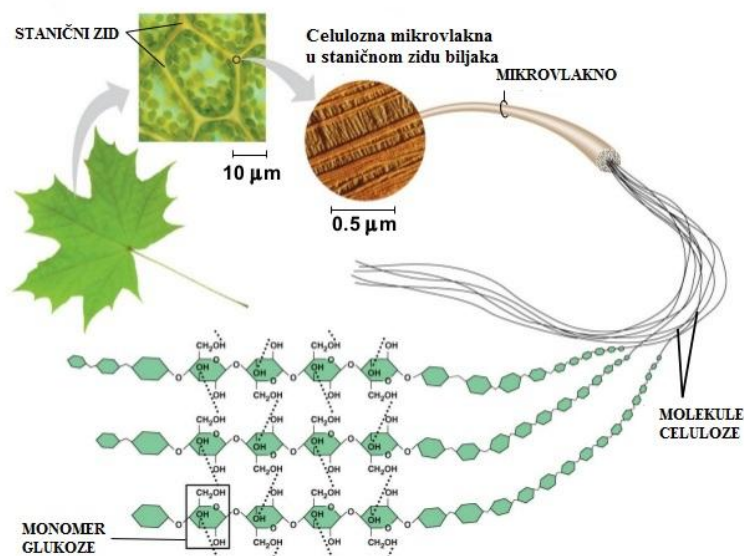
Lignocelulozna biomasa sastoji se od tri polimera: (1) celuloze (40-50%), (2) hemiceluloze (25-35%) i (3) lignina (15-20%) uz manje količine ostalih komponenti kao što su acetilne grupe, minerali i fenoli (Isikgor i Becer, 2015). Također, može sadržavati i manje količine pektina, proteina, pepela i ekstraktivnih tvari. Ovisno o vrsti lignocelulozne biomase, ti polimeri su organizirani u trodimenzionalnu strukturu koja joj omogućuje otpornost na enzimsku i kiselinsku hidrolizu (Slika 1.).



Slika 1. Struktura lignoceluloznih sirovina (preuzeto od: Isikgor i Becer, 2015)

### 2.1.1.1. Celuloza

Celuloza kao najzastupljeniji polisaharid u lignoceluloznim sirovinama čini oko 40-50% njene mase (Pandey, 2011). Ovaj homopolisaharid sastoji se od dugih ravnih lanaca s do 10000-15000 jedinica D-glukoze međusobno povezanih  $\beta$ -glikozidnom vezom (Slika 2.). Karakteristika ovog polisaharida je visoki stupanj kristaličnosti koja je rezultat velikog broja vodikovih veza kojima su povezani lanci celuloze. Hidroksilne skupine u lancima celuloze omogućuju stvaranje vodikovih veza unutar istoga lanca celuloze (intramolekulske vodikove veze), ali i između susjednih lanaca (intermolekulske vodikove veze) što rezultira paralelnim slaganjem lanaca celuloze (Isikgor i Becer, 2015; Demirbas, 2005). Na taj način nastaju tzv. osnovna vlakna (do 36 celuloznih lanaca), a koja se zatim povezuju u mikrofibrole debljine oko 3-nm (Mutwil, 2008). Tako formirana struktura netopljiva je u vodi čime je celuloza otpornija na enzimsku hidrolizu uslijed smanjene dostupne površine za djelovanje celulitičkih enzima (Faraco, 2013). Celulozna mikrovlakna su povezana međusobno s hemicelulozom te obavijeni ligninom, što staničnoj stijenci daje mehaničku čvrstoću i otpornost na vanjske stresove i unutarnje osmotske tlakove.

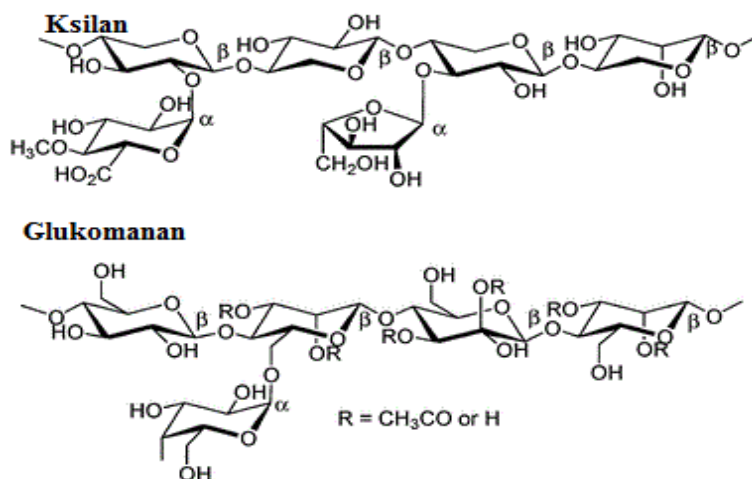


**Slika 2.** Struktura celuloze (preuzeto od:Reece i sur., 2011)

### 2.1.1.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza je heterogeni polimer građen od šećera pentoza (ksiloza, arabinoza), heksoza (manoza, galaktoza, glukoza) i šećernih kiselina (glukuronska, metilglukuronska, galakturonska kiselina) (Pandey, 2011; Demirbas, 2005). Najvažniji i najzastupljeniji šećeri su ksilan i glukomanan (Slika 3.) (Demirbas, 2009; Pandey, 2011; Dutta i sur., 2012). Hemiceluloza obavija celulozna vlakna i predstavlja vezu između celuloze i lignina i ponaša se kao „ljepilo“ (Chandel i sur., 2012). Za razliku od celuloze, hemiceluloza se sastoji od različitih monomernih jedinica te su njeni polimerni lanci kraći su od celuloznih. Hidroksilne skupine ksiloznih jedinica u hemicelulozi djelomično su esterificirane s karboksilnim kiselinama kao što su: octena (49%), ferulinska (4%) i kumarinska kiselina (6%) (Van Dongen i sur., 2011). Osim toga zbog svoje razgranatosti, karakterizira ju amorfna struktura zbog koje je hemiceluloza topljivija u vodi i lakše ju je hidrolizirati djelovanjem hemicelulaza.

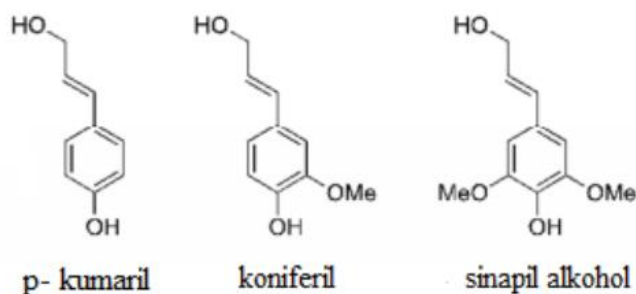




**Slika 3.** Struktura ksilana i glukomanana (preuzeto od: Dutta i sur., 2012)

### 2.1.1.3. Lignin

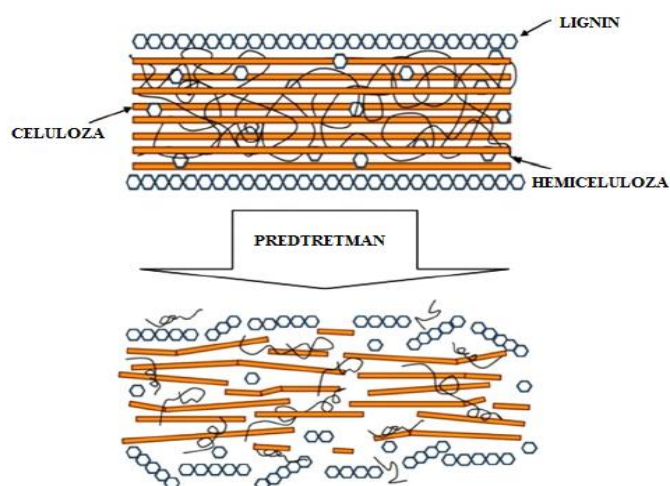
Lignin je kompleksan trodimenzionalan polimer koji se sastoji od različitih fenilpropanskih jedinica kao što su kumaril alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol (Slika 4.), povezanih C-O ili C-C vezama (Pandey, 2011). Djeluje kao celularno ljepilo koje daje čvrstoću biljnom tkivu i individualnim vlaknima, krutost staničnom zidu i otpornost na insekte i patogene (Isikgor i Becer, 2015). Osim toga, ključan je za efikasno dobavljanje vode u biljkama gdje za razliku od polisaharida stanične stjenke koji su hidrofilni, svojom hidrofornom strukturom tvori nepropusnu prepreku u staničnoj stijenci (Demirbas, 2009). Od triju komponenata lignoceluloze lignin je najotporniji na degradaciju (Howard i sur., 2003).



**Slika 4.** Građevne jedinice lignina (preuzeto od: Ratnaweera i sur., 2015)

### 2.1.2. Predobrada lignocelulozne sirovine

Predtretman lignocelulozne sirovine je nužan kako bi se izmijenila struktura lignocelulozne biomase s ciljem osiguravanja veće dostupnosti celuloze za njenu efikasnu hidrolizu. Svrha predtretmana je ukloniti lignin i hemicelulozu, smanjiti kristaličnost celuloze i povećati poroznost lignoceluloznog materijala (Slika 5.; Kumar i sur., 2009). S visinom troškova od 7,94 c/L proizvedenog etanola, pretretman je jedan od najskupljih koraka procesa proizvodnje biogoriva iz lignocelulozne biomase (Moiser i sur., 2004). Metode predobrade lignocelulozne sirovine dijele se na: (1) fizikalne (mljevenje, piroliza, tretman parom, ekspanzija, ekstruzija), (2) kemijske (kiselinska preobrada sumpornom/dušičnom/fosfatnom kiselinom; alkalna predobrada natrijevim/kalijevim hidroksidom; predobrada organskim otapalima ili ionskim tekućinama, ozonoliza), (3) fizikalno-kemijske (tretman parom/autohidroliza; hidrotermoliza i mokra oksidacija) i (4) biološke metode (gljive i aktinomiceti) (Galbe i Zacchi, 2007; Pandey, 2011).



**Slika 5.** Shematski prikaz efekta predtretmana lignocelulozne sirovine (preuzeto od: Mood i sur., 2013)

#### 2.1.2.1. Fizikalna predobrada

Fizikalnim metodama predobrade postiže se povećanje kontaktne površine lignocelulozne sirovine uslijed smanjenja stupnja polimerizacije, djelomična ili potpuna hidroliza hemiceluloze te smanjenje kristaličnosti celuloze (Bajpai, 2016). Mehaničkim usitnjavanjem i mljevenjem sirovina se prevodi u fini prah čime se povećava kontaktna površina celuloze,

smanjuje njena kristaličnost što poboljšava njenu razgradnju u daljnjim koracima procesa. Veličina materijala nakon usitnjavanja je od 10 do 30 mm, a nakon mljevenja od 0,2-2 mm. No utrošak energije tijekom ovih procesa je vrlo visok te je često veći od teorijski određenog sadržaja energije same lignocelulozne biomase (Galbe i Zacchi, 2007; Kumar i sur. 2009). U ovu skupinu spada i zračenje sirovine gama zrakama koje cijepaju  $\beta$ -1,4-glikozidnu vezu, a koja je također preskupa za komercijalnu primjenu. Stoga su glavni nedostaci i problemi metoda fizikalne predobrade sirovine, visoka potrošnja energije, velike oscilacije cijena i uspješnosti predtretmana uz slabije uklanjanje lignina u usporedbi s drugim metodama predobrade (Mousdale, 2008).

#### **2.1.2.2. Kemijske metode**

Ozonoliza, kiselinska ili alkalna hidroliza i oksidativna delignifikacija samo su neke od brojnih kemijskih metoda kojima se postiže povećanje kontaktne površine sirovine, smanjenje stupanja polimerizacije, djelomična ili potpuna hidroliza hemiceluloze te djelomična razgradnja lignina. Ozonskim tretmanom sirovine postiže se smanjenje sadržaja lignina, dok je hemiceluloza slabije razgrađena, a celuloza ostaje intaktna (Kumar i sur. 2009). Osim toga tijekom ovog predtretmana koji se provodi na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku ne dolazi do nastajanja toksičnih i inhibitornih nusproizvoda. No, budući da su potrebne velike količine ozona ovaj proces je veoma skup. Za kiselinsku predobradu lignocelulozne biomase najčešće se koriste sumporna i klorovodična kiselina koje, iako su dobri agensi za hidrolizu celuloze su također korozivne i toksične kemikalije koje je, kada se koriste kao koncentrirane kiseline poslije tretmana potrebno regenerirati i zbrinuti na način siguran za okoliš. Stoga se najčešće provodi predtretman s razrijeđenim kiselina u kojima nije potrebna reciklacija i to pri povišenim temperaturama od 140 do 200 °C kroz određeno vrijeme. Uz metodu eksplozije s vodenom parom, predtretman razrijeđenim kiselinama je najistraživanija metoda predobrade (Sanchez i Cordona, 2007). Najčešće korištena kiselina je  $H_2SO_4$  u koncentraciji do 4%, pri čemu se najviše razgradi hemiceluloza. Naime, brzina hidrolize hemiceluloze kiselinama značajno je brža od hidrolize celuloze (Lenihan i sur., 2009). No tijekom ovog predtretmana nastaju i toksične supstance koje mogu negativno utjecati na proces fermentacije (Palmqvist i Hagerdal, 2000). Nakupljanje nusproizvoda se povećava s povećanjem temperature i povećanjem vremena zadržavanja (Hu i sur., 2010). Osim toga, nakon predtretmana potrebno je neutralizirati suspenziju lignocelulozne sirovine, a ukoliko se koristi gašeno vapno nastaju

velike količine otpada koji je potrebno na odgovarajući način zbrinuti što također povećava troškove proizvodnje.

Alkalna predobrada lignoceluloznih sirovina se provodi primjenom lužina uz niže temperature i tlakove u usporedbi s drugim metodama. No, predobrada u takvim uvjetima se mora provesti u dužem periodu koji može varirati od nekoliko sati pa sve do nekoliko dana. Alkalna predobrada rezultira delignifikacijom uslijed pucanja veze između lignina i ugljikohidrata te je učinkovitija kod lignoceluloznih materijala koji sadrže manje lignina kao što su biljni i poljoprivredni ostaci (Galbe i Zacchi, 2007). Predtretman lužinom uzrokuje bubrenje vlakana što povećava unutarnju površinu, a ujedno se smanjuje stupanj polimerizacije i kristalčnosti celuloze te hidroliziraju esterske veze u hemicelulozi i povećava poroznost sirovine (Chen i sur., 2013; Galbe i Zacchi, 2007; Cao i sur., 2012). U usporedbi s kiselinskom hidrolizom, predobrada lužinom uzrokuje manji stupanj degradacije šećera te nastaje manje inhibitora. Najčešće korištena lužina je natrijeva, ali se za alkalnu predobradu mogu još upotrijebiti kalcijeva i kalijeva lužina i amonijev hidroksid (Kumar i sur., 2009). U kemijske metode spada i primjena organskih otapala u kombinaciji s anorganskim kiselinama ( $H_2SO_4$  ili  $HCl$ ) kao katalizatorima za kidanje unutarnjih veza lignina i hemiceluloze. Najčešće korištena otapala su metanol, etanol, aceton, etilenglikol, trieten glikol i fenol (Kumar i sur., 2009).

### **2.1.2.3. Fizikalno- kemijske metode**

Ova skupina obuhvaća metode između fizikalnih i kemijskih metoda, ili njihovu kombinaciju. U ovu skupinu pripada eksplozijom vodenom parom koja je ujedno i jedna od najčešće korištenih metoda za predobradu lignocelulozne sirovine. Lignocelulozna biomasa se u ovom tretmanu izlaže zasićenoj pari visokoga tlaka kroz nekoliko sekundi do nekoliko minuta (temperature od 160 do 260 °C i tlakovi od 0,69 do 4,83 Mpa) nakon čega se materijal izlaže atmosferskom tlaku uslijed čega dolazi do eksplozivne dekompresije materijala (Kumar i sur., 2009; Galbe i Zacchi, 2007). Tijekom procesa dolazi do degradacije hemiceluloze kiselinama oslobođenim tijekom predtretmana (octena kis.) i transformacije lignina uslijed djelovanja visoke temperature, što poboljšava enzimsku hidrolizu celuloze. Slična metoda je i eksplozija vlakana amonijakom tzv. AFEX u kojem se lignocelulozni materijal izlaže tekućem amonijaku na visokoj temperaturi i tlaku kroz određeno vrijeme, nakon čega se naglo smanjuje tlak. Slične fizikalno-kemijske metode su i eksplozija primjenom superkritičnog ugljikovog dioksida, tretman vrućom vodom (hidrotermoliza) i mokri oksidacijski

predtretman. Glavni nedostaci ovih metoda su nepotpuno uklanjanje lignina i nastajanje inhibitora fermentacije, dok su glavne prednosti niža potrošnja energije u usporedbi s fizikalnim metodama i minimalna nužna primjena kemikalija (Barrett i sur., 2009).

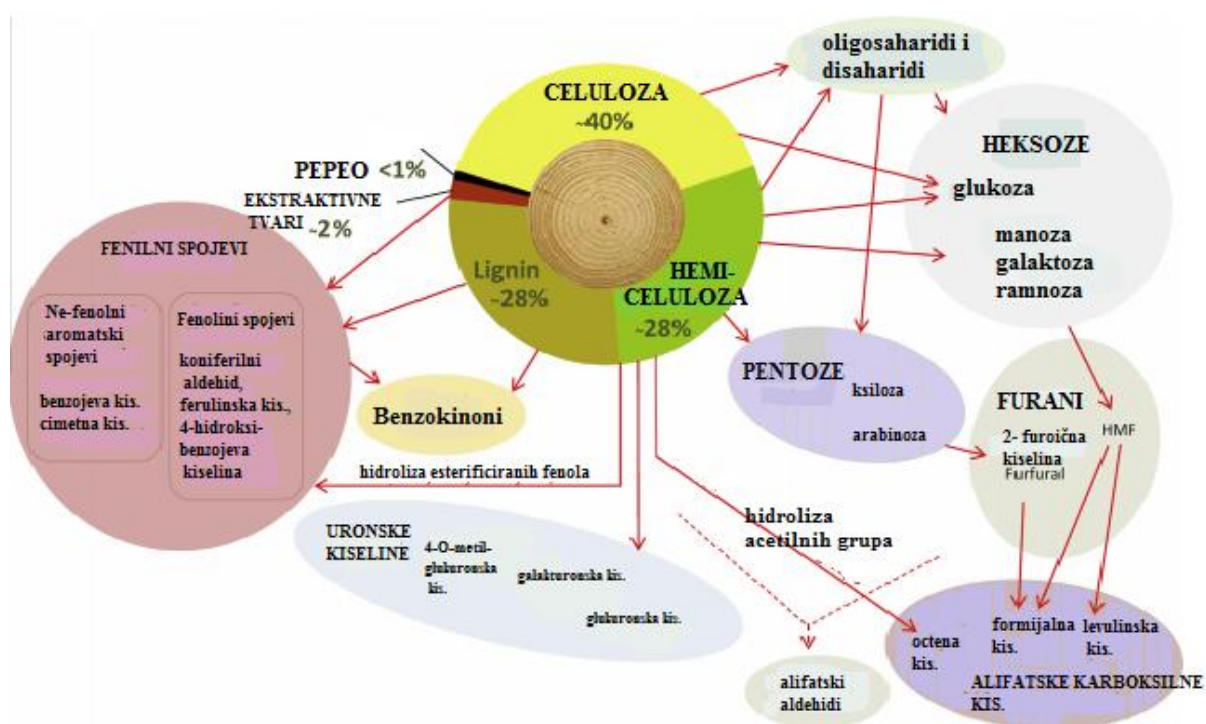
#### **2.1.2.4. Biološke metode**

Biološka predobrada može se provesti primjenom mikroorganizama koji imaju sposobnost degradacije lignina kao što su gljive bijelog, smeđeg i mekog truljenja. Ova metoda smatra se ekološki prihvatljivom budući da za provedbu nije potrebna skupa i komplicirana oprema, a utrošak energije je mali. No nedostatak ove metode je što uz razgradnju lignina, dolazi i do gubitka materijala uslijed razgradnje hemiceluloze i celuloze. Tako primjerice gljive smeđeg truljenja uglavnom napadaju celulozu, a gljive bijelog i mekog truljenja razgrađuju lignin i celulozu (Kumar i sur., 2009). Metodama genetičkog inženjerstva nastoji se modificirati ove tipove gljiva s ciljem sprječavanja neželjene razgradnje celuloze i hemiceluloze (Carrere i sur., 2015). Gljive bijelog truljenja (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Cyathus stercoreus*) smatraju se najboljima u razgradnji lignoceluloznih sirovina (Fan, 2011), a koja se odvija pomoću specifičnih lakaza i peroksidaza. Od ostalih mikroorganizama za provođenje biološke predobrade lignocelulozne sirovine primjenjuju se bakterije kao primjerice *Zymomonas mobilis* i druge vrste iz porodice *Lactobacillaceae*.

#### **2.1.3. Inhibitori koji nastaju tijekom predobrade**

Tijekom predobrade lignocelulozne sirovine na povišenim temperaturama nastaje niz kemijskih spojeva koji mogu imati inhibitorno djelovanje i na celulolitičke enzime i na rast proizvodnog mikroorganizma. Prema podrijetlu inhibitora mogu se podijeliti u tri skupine: (1) komponente prisutne u strukturi lignoceluloznih sirovina, (2) komponente nastale degradacijom lignoceluloznih sirovina i (3) komponente prisutne na lignoceluloznim sirovinama (Harmsen i sur., 2013). U prvu skupinu spadaju tvari već prisutne u lignoceluloznoj biomasi, te tijekom degradacije polimera na njihove monomerne jedinice ujedno dolazi i do oslobađanja inhibirajućih aldehida i fenolnih komponenti. U strukturi hemiceluloze su prisutne različite kiseline (octena, glukuronska i galakturonska) koje također mogu imati inhibirajući učinak na rast proizvodnog mikroorganizma (Harmsen i sur., 2013). Najzastupljeniji inhibitori koji pripadaju drugoj skupini, odnosno nastaju razgradnjom lignocelulozne sirovine su: furan aldehidi, fenolni spojevi, karboksilne kiseline i derivati

lignina. Za procese predobrade pomoću kiselina karakteristično je nastajanje furfurala degradacijom pentoza i 5-hidroksimetilfurfurala (HMF) razgradnjom heksoza. HMF se pri dužem izlaganju visokim temperaturama i visokim koncentracijama kiselina degradira do levulinske i mravlje kiseline, dok se furfural degradira do furoične i mravlje kiseline (Harmsen i sur., 2013; Jönsson i Martin, 2015). Hidrolizom acetilnih grupa u hemicelulozi nastaje octena kiselina, a degradacijom lignina nastaju različiti fenolni spojevi (Jönsson i sur., 2013). Najzastupljeniji fenolni spojevi su: 4-hidroksibenzojeva kiselina, 4-hidroksibenzaldehid, vanilin, dihidroksikoniferilni alkohol itd. Nastajanje inhibitora degradacijom lignocelulozne biomase prikazano je na Slici 6. U treću skupinu inhibitora spadaju one komponente koje su prisutne na lignoceluloznoj sirovini, ali nisu njen sastavni dio. Primjerice, ako se koristi lignocelulozna sirovina koja potječe iz zagađenog okoliša, na njoj se mogu nalaziti dušikovi i sumporni spojevi. Različiti dodatci koji se koriste u poljoprivredi i pesticidi također mogu inhibitorno djelovati na radni mikroorganizam (Harmsen i sur., 2013).



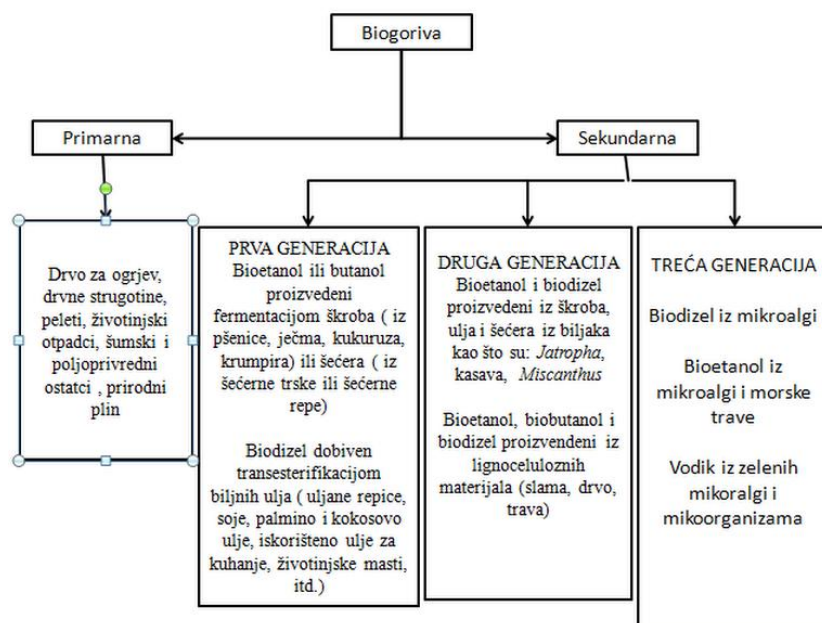
**Slika 6.** Nastajanje inhibitora degradacijom lignocelulozne biomase (preuzeto od: Jönsson i Martin, 2015.)

## **2.2. Biogoriva**

Biogoriva se definiraju kao čvrsta, tekuća ili plinovita goriva proizvedena iz biomase (Rezić, 2013; Dragone i sur., 2010; Ivančić-Šantek i sur. 2016). Biomasa se smatra organska komponenta bilo kojeg materijala biološkog podrijetla (Howard i sur., 2003). Predstavlja obnovljivi izvor energije, a općenito se može podijeliti na drvenu i nedrvnu biomasu i životinjski otpad (Rezić, 2013). Glavna prednost biogoriva u odnosu na fosilna goriva je smanjena emisija stakleničkih plinova, osobito ugljikovog dioksida i metana, te se biogoriva smatraju CO<sub>2</sub> neutralna budući da se ugljikov dioksid oslobođen izgaranjem biogoriva utroši tijekom rasta sirovina za njegovu proizvodnju (Koh i Ghazoul, 2008). Morales i suradnici su usporedbom rezultata šest studija o analizi životnog ciklusa (LCA analiza) bioetanol došli do zaključka kako je u usporedbi s fosilnim gorivima upotrebom E10 benzina redukcija emisije stakleničkih plinova bila manja od 10 %, a za E85 i E100 goriva veća od 40 % odnosno 50 % (Morales i sur., 2014). U Europskoj uniji se u značajnijim količinama proizvode dvije vrste biogoriva, bioetanol i biodizel. U 2014. godini u EU je, prema podacima Eurostata3 iskorišteno 14 370 ktoe (ekvivalenta tisuća tona nafte), od čega 11 367 ktoe otpada na biodizel (4 % ukupnog goriva za promet) i 2637 ktoe na mješavinu benzina i bioetanol odnosno biobenzina (0,9 % ukupnog goriva za promet; ECA, 2016). Biogoriva se općenito dijele u dvije kategorije: primarna i sekundarna biogoriva. Primarna biogoriva obuhvaćaju prirodni plin i drvo za ogrijev koji se najčešće koriste za grijanje, kuhanje i proizvodnju električne energije. Sekundarna biogoriva kao biodizel i bioetanol koriste se kao goriva u prijevoznim sredstvima i u različitim industrijskim procesima. Kao što je prikazano na Slici 7., sekundarna biogoriva se ovisno o sirovini za proizvodnju, dijele na biogoriva prve, druge i treće generacije (Dragone i sur.,2010).

### **2.2.1. Biogoriva prve generacije**

Biogoriva prve generacije se proizvode iz škrobnih (kukuruz, pšenica, ječam, krumpir) i šećernih (melasa, šećerna repa, šećerna trska) sirovina te iz jestivih biljnih ulja (repičino, palmino, suncokretovo). Međutim, sirovine za proizvodnju goriva prve generacije također se koriste i u proizvodnji hrane i krmiva. To dovodi do kompeticije proizvođača biogoriva i proizvođača hrane za istu sirovinu i površinu potrebnu za uzgoj iste, što utječe na globalnu sigurnost na tržištu hrane (Guo i sur., 2015, Morales i sur., 2014).



Slika 7. Podjela biogoriva (preuzeto od: Dragone i sur., 2010)

Tako je primjerice proizvodnja bioetanol značajno utjecala na cijenu žitarica u SAD-u, budući da je 2011. godine 40 % uroda kukuruza utrošeno u proizvodnju etanola (Pelkmans i sur., 2014). Osim toga cijena goriva prve generacije je nestabilna zbog promjena cijena fosilnih goriva i cijena na poljoprivrednom tržištu (Morales i sur., 2015). Međutim, većina komercijalno dostupnih biogoriva još uvijek se proizvode iz šećernih ili škrobnih žitarica (proizvodnja bioetanol) te uljarica (proizvodnja biodizela) (Koh i Gazoul, 2008; Morales i sur., 2015; Guo i sur., 2015; Ivančić-Šantek i sur., 2016). Ali zbog već ranije navedenih nedostataka novija istraživanja su usmjerena razvoju ekonomski isplativih i ekološki prihvatljivih procesa proizvodnje biogoriva iz obnovljivih i otpadnih sirovina kao što je lignocelulozna biomasa (Vassilev i sur., 2015; Ivančić-Šantek i sur., 2016).

### 2.2.2. Biogoriva druge generacije

Biogoriva druge generacije mogu se proizvesti gotovo iz bilo kojeg lignoceluloznog materijala kao što je kukuruzovina, slama, bagasa, trava, drvena biomasa, ali i iz sjemenki biljke *Jatropha* te gradskog čvrstog otpada (Nguyen i sur., 2017). Konačni produkt može biti etanol, biodizel, gorivo za zrakoplove ili neka od mnogih industrijskih biokemikalija. Ove sirovine se ne rabe u prehrani ljudi i stoke, te su ujedno i znatno jeftinije od sirovina za proizvodnju biogoriva prve generacije. Budući da ne utječu na porast cijene prehrambenih



proizvoda time ne doprinose ekonomskim i društveno-političkim nestabilnostima nerazvijenih, ali i razvijenih regija svijeta (Blaschek i sur., 2010). Zbog složenog procesa proizvodnje koji se sastoji od tri koraka, predtretmana, hidrolize i fermentacije, komercijalna proizvodnja dugo vremena nije bila isplativa (Naik i sur., 2009; Nguyen i sur., 2017). No danas je komercijalna proizvodnja biogoriva druge generacije u praksi i nekoliko postrojenja je započelo s radom tijekom 2014. i 2015. godine. Trenutno je u pogonu 67 postrojenja za proizvodnju biogoriva druge generacije, od kojih trećina proizvodi u komercijalnom mjerilu (Nguyen i sur., 2017).

### **2.2.3. Biogoriva treće generacije**

Biogoriva proizvedena iz biomase algi i drugih organizama predstavljaju treću generaciju (Rezić, 2013; Ivančić-Šantek i sur., 2016; Mabee i sur., 2008). Zahvaljujući visokom udjelu lipida i ugljikohidrata, sposobnosti rasta u različitim vodenim okolišima (slane i slatke vode), velikoj brzini rasta, maloj površini potrebnoj za kultivaciju i visokoj razini absorpcije ugljikovog dioksida, alge predstavljaju obećavajuću alternativnu sirovinu za proizvodnju biogoriva (Jambo i sur., 2016). No s cijenom biogoriva proizvedenog iz algi od 300-2600 US\$, ova tehnologija još uvijek nije konkurentna fosilnim gorivima (Hannon i sur., 2010). Mnoge prepreke kao što su identifikacija sojeva, njihovo poboljšanje metodama genetičkog inženjerstva, optimizacija proizvodnje itd., moraju se savladati kako bi ova tehnologija bila ekonomski isplativa i konkurentna na tržištu (Hannon i sur., 2010).

### **2.2.4. Bioetanol**

Bioetanol je obnovljivi izvor energije koji se proizvodi mikrobnom fermentacijom šećera (Sun i Cheng, 2001). Danas se bioetanol uglavnom koristi kao gorivo ili dodatak gorivu u pogonskim motorima, ali također se može iskoristiti kao raznolika sirovina u kemijskoj industriji (Rass-Hansen i sur., 2007). Oko 90 % bioetanola proizvodi se u Sjedinjenim Američkim Državama i Brazilu (Ivančić Šantek i sur., 2016; Koh i Ghazoul, 2008; Morales i sur., 2015). Etanol je pogodno alternativno gorivo budući da se može miješati s benzinom ili se koristiti čist u prilagođenim motorima (Galbi i Zacchi, 2007), a ujedno pokazuje povoljnija svojstva kao što su veći oktanski broj i viša toplina isparavanja (Chen i Qiu, 2010). Oktanski broj određuje otpornost određenog benzina na detonantno izgaranje (L. McCromick, 2015), a dodatkom 10 % etanola benzinu povećava se oktanski broj goriva za 3-4 (Ivančić-Šantek i

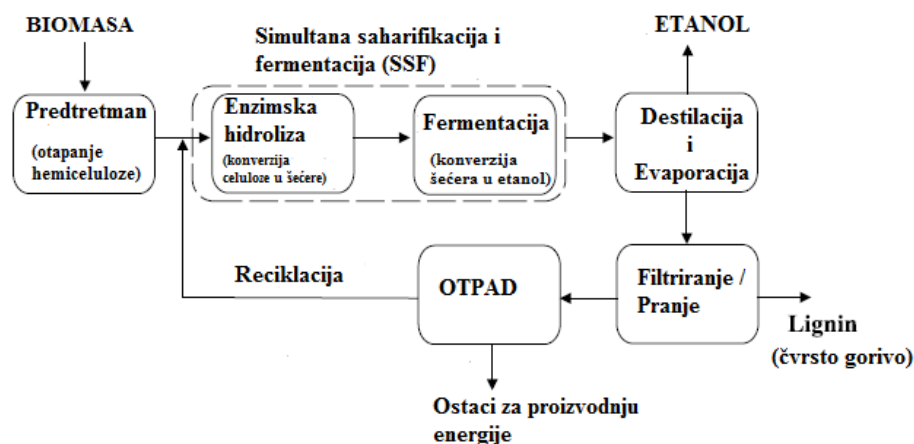
sur., 2016). Osim toga, prednost bioetanola u odnosu na benzin je što molekula etanola sadrži kisik, a to omogućuje potpunije sagorijevanje ugljikovodika (Yüksel i Yüksel, 2004). Nadalje, upotrebom bioetanola smanjuje se emisija stakleničkih plinova, posebice ugljikovog monoksida i dušikovih oksida kao i toksičnih aromatskih spojeva (Zhang i sur., 2012, Ivančić-Šantek i sur. 2016; Turner i sur., 2011). Pri mješanju s benzinom, udio etanola može iznositi od 5 % do 85 % (goriva E5-E85), pri čemu je potrebno koristiti etanol čistoće od 95,5-99,8 %. Gorivo pod nazivom E85 najviše se koristi u SAD-u i nekim europskim državama kao npr. Švedskoj, dok se u Brazilu koristi etanol sa svega 5% vode koji se naziva E100 (Ivančić-Šantek i sur., 2016). Za primjenu takvih goriva s većim volumnim udjelom etanola kao E85, na tržištu su dostupni prilagođeni tzv. flexi-fuel automobili (Sun i Cheng, 2001). Usporedba fizikalno-kemijskih svojstava benzina i bioetanola prikazana je u Tablici 1. Komercijalni bioetanol se proizvodi većinom iz škrobnih i šećernih sirovina (šećerna trska, šećerna repa, pšenica, kukuruz, krumpir, kasava) (Morales i sur., 2015; Guo i sur., 2015). Za razliku od SAD-a gdje je kukuruz glavna sirovina za proizvodnju, u Europi se za proizvodnju bioetanola druge generacije najčešće koriste slama i drugi poljoprivredni ostaci. Stupanj konverzije tih supstrata u etanol je relativno nizak što povećava troškove proizvodnje te čini etanol skupljim u odnosu na fosilna goriva (Rass-Hansen i sur., 2007; Howard i sru., 2003). Upravo iz tog razloga novija istraživanja se usmjeravaju na razvijanje i poboljšanje procesa proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina.

**Tablica 1.** Usporedba fizikalno-kemijskih svojstava benzina i etanola (Yüksel i Yüksel, 2004)

SVOJSTVA	Etanol	Benzin
Kemijski sastav	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Ugljikovodici C <sub>4</sub> -C <sub>12</sub>
Molarna masa (g mol <sup>-1</sup> )	46,07	100-105
Oktanski broj	108	88-100
Gustoća (kg dm <sup>-3</sup> )	0,79	0,69-0,79
Donja ogrijevna vrijednos (103 kJ dm <sup>-3</sup> )	21,1	30-33
Vrelište °C	78	27-225
Ledište °C	-114	-40
Plamište °C	13	-43
Latentna toplina isparavnja (kJ kg <sup>-1</sup> )	854	289
Topljivost u vodi	topljiv	netopljiv
Temperatura samozapaljenja °C	423	257

### 2.2.4.1. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina

Zbog kompleksnosti procesa proizvodnje bioetanola iz lignocelulozne biomase, cijena gotovog proizvoda je još uvijek veća od cijene etanola dobivenog iz šećerne trske, šećerne repe ili kukuruza (Ivančić Šantek i sur., 2016). Za konverziju lignocelulozne biomase u biogorivo, celuloza i hemiceluloza moraju se razgraditi na njihove građevne monomere, odnosno jednostavne šećere koje radni mikroorganizam može metabolizirati (Kumar i sur., 2009). Stoga se proces proizvodnje biogoriva sastoji od četiri glavna koraka: (1) predobrada lignocelulozne sirovine, (2) hidroliza strukturnih ugljikohidrata (celuloze i hemiceluloze), (3) fermentacija pomoću odgovarajućeg radnog mikroorganizma i (4) izdvajanje i pročišćavanje proizvoda (npr. destilacija i dehidracija; Slika 8.) (Morales i sur., 2015; Moiser i sur., 2004). Predobrada je nužna kako bi se struktura lignocelulozne biomase izmjenila na mikroskopskoj i na makroskopskoj razini, s ciljem povećanja dostupnosti celuloze kiselinama i enzimima tijekom procesa saharifikacije i hidrolize (Morales i sur., 2015). Time se postiže brža hidroliza ugljikohidrata na monomernu šećere i veći prinosi (Moiser i sur., 2004).



**Slika 8.** Shema procesa proizvodnje biogoriva iz biomase (preuzeto iz: Galbe i Zacchi, 2007)

Proces hidrolize celuloze uključuje (1) kiselinu hidrolizu (npr. sumporna kiselina) i (2) enzimsku hidrolizu (Kumar i sur., 2009). Enzimskom hidrolizom celuloze unaprijeđuje se tehnologija što omogućuje da bioetanol proizveden iz lignocelulozne biomase bude kompetitivan s drugim tekućim gorivima (Moiser i sur., 2004). Najčešće se provodi pomoću komercijalno dostupnih celulolitičkih enzima izoliranih iz plijesni *Trichoderma reesei* i *Aspergillus niger* (Nieves i sur., 1997; Bischof i sur., 2016). Osim što se može provesti prije fermentacije, enzimsku hidrolizu se može odvijati i u prisustvu radnog mikroorganizma, a

takav proces se onda naziva simultana saharifikacija i fermentacija. Heksoze kao što su glukoza, galatkoza i manozna lako se fermentiraju u etanol pomoću prirodno prisutnih mikroorganizama kao što su različiti kvasaci: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, *S. amucae* i *Kluveromyces lactis* (Moiser i sur., 2004; Kumar i sur., 2009). No tijekom hidrolize, uslijed kompleksne strukture osim heksoza nastaju i pentozni šećeri kao što su ksiloza i arabinoza koje je također potrebno iskoristiti. Stoga je nužno koristiti mikroorganizme koji imaju sposobnost metaboliziranja što većeg broja različitih šećera (heksoze i pentoze) s ciljem osiguravanja ekonomske isplativosti ovog bioprocesa. Iz tog razloga se u novije vrijeme sve više koriste mikroorganizmi modificirani metodama genetičkog inženjerstva kao što su: *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae* (Kumar i sur., 2009; Helle i sur., 2003). Na kraju procesa etanol se izdvaja iz fermentirane komine destilacijom ili kombinacijom destilacije i adsorpcije (Gulati i sur. 1996; Kumar i sur., 2009). Naime, smjesa etanola s vodom čini azeotropnu smjesu ( $w=95,6\%$ ) pri temperaturi od  $78,15\text{ }^{\circ}\text{C}$  zbog čega je izdvajanje etanola potrebno provoditi u dva stupnja. Prvi je (1) jednostavna destilacija čime se postiže čistoća od  $92,4\%$  etanola ( $w$ ), a zatim slijedi (2) dehidracija etanola primjenom: (a) azeotropne destilacije, (b) ekstraktivne destilacije, (c) ekstrakcije tekuće-tekuće ili (d) adsorpcije (Ivančić Šantek i sur., 2016). Značajne uštede u ovom energetski najzahtjevnijem stupnju procesa, mogu se postići integracijom fermentacije i procesa izdvajanja i pročišćavanja etanola. Osim toga, otpad zaostao na dnu destilacijske kolone (preostao lignin, nerazgrađena celuloza i hemiceluloza, pepeo, mikroorganizmi) može se koncentrirati i iskoristiti za dobivanje energije spaljivanjem ili konvertirati u različite produkte (Wooley i sur., 1999; Moiser i sur., 2004). Time se smanjuju troškovi i stvara dodatna vrijednost čime se povećava ekonomska isplativost procesa.

#### **2.2.4.2. Radni mikroorganizam**

##### **2.2.4.2.1. Kvasac**

U komercijalnoj proizvodnji etanola najčešći korišteni mikroorganizam je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Ovaj radni mikroorganizam karakterizira GRAS status (eng. Generally Recognized as Safe), visoki prinos etanola ( $\approx 0,45\text{--}0,50$  grama etanola po gramu glukoze), visoka produktivnost ( $2\text{--}5\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ) te sposobnost rasta pri visokim koncentracijama šećera i etanola (Ivančić Šantek i sur., 2016). Kvasac može metabolizirati glukozu, fruktozu, saharozu i maltozu, ali ne i pentoze kao što je ksiloza. Osnovni put razgradnje glukoze u

stanicama kvasca *S. cerevisiae* odvija se glikolizom (Embeden-Meyerhof-Parnasov put) u kojem iz jedne molekule glukoze nastaju dvije molekule piruvata. Piruvat se zatim u anaerobnim uvjetima dekarboksilira u acetaldehid, što katalizira enzim piruvat-dekarboksilaza. Acetaldehid se potom reducira djelovanjem enzima alkohol-dehidrogenaze u etanol što je popraćeno oksidacijom koenzima NADH u NAD<sup>+</sup>. Ovim putem razgradnje glukoze nastaju i dvije molekule ATP-a. Osim etanola, tijekom alkoholne fermentacije nastaju i ugljikov dioksid i drugi različiti nusproizvodi: glicerol, organske kiseline, viši alkoholi. Iako je alkoholna fermentacija prirodno zaštićen proces, do kontaminacije može doći i to najčešće bakterijama mliječne kiseline, divljim kvascima i bakterijama octene kiseline. Budući da kontaminacija uzrokuje značajno smanjenje prinos etanola i inhibiciju rasta kvasca, ona se suzbija primjenom antibiotika među kojima se najčešće koriste: penicilin (inhibira sintezu stanične stijenke) i virginiamicin (inhibira sintezu proteina) (Ivančić Šantek i sur., 2016). Za proizvodnju bioetanola iz hidrolizata lignocelulozne sirovine bitna je sposobnost fermentacije ksiloze. Stoga se primjenom metoda genetičkog inženjerstva nastoji modificirati kvasac *S. cerevisiae* kako bi imao sposobnost rasta na pentozama. Na taj način kvasac bi imao sposobnost metaboliziranja ksiloze koja tijekom predobrade lignocelulozne sirovine nastaje razgradnjom hemiceluloze, a to bi povoljno utjecalo na iskorištenost supstrata i ekonomsku isplativost procesa. Kvasci koji fermentiraju ksilozu kao što su *Pichia stipitis* i *Candida shehatae*, također bi se mogle koristiti za proizvodnju etanola, pogotovo na podlogama s visokim sadržajem ksilana. No njihova tolerancija na inhibirajuće spojeve u lignoceluloznim hidrolizatima je relativno mala (Olafsson i sur., 2008).

#### **2.2.4.2.2. Bakterije**

Iako još uvijek nije nađena zadovoljavajuća alternativa kvascu *S. cerevisiae*, istražuje se i primjena bakterija za proizvodnju bioteanola kao što su: *Zymomonas mobilis* i genetski modificirani soj *E. coli* (Olsson i Hanh-Hagerdal, 1996). *Z. mobilis* koristi Entner-Duodoroff put za proizvodnju etanola, koji daje manji prinos ATP-a po molu glukoze, što daje manji prinos biomase, a veći prinos etanola po glukozi u odnosu na *S. cerevisiae*. No ova bakterija nema sposobnost fermentacije pentoza. Rekombinantna *E. coli* daje visoke prinose od 0,36-0,51 g g<sup>-1</sup> u nizu različitih hidrolizata, no da bi se produktivnost postignuta u laboratorijskom mediju postigla i u hidrolizatima potrebna je detoksifikacija. Općenito se smatra kako su bakterije manje tolerantne na inhibitore prisutne u hidrolizatima od kvasaca (Olafsson i sur., 2008).

**EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Sirovina

Lignocelulozna sirovina korištena u ovom radu bila je pšenična slama s 92,8 % suhe tvari, podrijetlom iz Hrvatskog Zagorja (Slika 9). Sirovina je usitnjena pomoću mlina čekičara (mlin čekičar – tip NA45; Megametal d.o.o., Nedelišće, Hrvatska) s veličinom sita 5 mm.



**Slika 9.** Pšenična slama

##### 3.1.2. Radni mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam korištena su dva soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Korišten je divlji soj kvasca *S. cerevisiae* i genetički modificirani soj *S. cerevisiae* Y9 (iz zbirke mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta).

### 3.1.3. Kemikalije

Kemikalije korištene u ovom radu navedene su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Kemikalije korištene u istraživanju

<u>Naziv</u>	<u>Proizvođač</u>
<b>Glukoza</b>	Difco, USA
<b>Kvašćev ekstrakt</b>	Roth, Austrija
<b>Diamonijev fosfat</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Diamonijev sulfat</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Sladni agar</b>	Difco, USA
<b>Sumporna kiselina</b>	Acros Organics, Belgija
<b>Kalcijev hidroksid</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Cinkov sulfat heptahidrat</b>	Merck, Njemačka
<b>Fosfatna kiselina</b>	Fluka, Njemačka
<b>Etanol (96%)</b>	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
<b>Demineralizirana voda</b>	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

### 3.1.4. Hranjive podloge za održavanje i uzgoj kvasca *S. cerevisiae*

#### 3.1.4.1. Hranjiva podloga za održavanje čiste kulture

Čista kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (divlji soj i soj Y9) održavana je na kosim podlogama sa sladnim agarom uz dodatak 20 g L<sup>-1</sup> glukoze.

#### 3.1.4.2. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma

Za uzgoj inokuluma pripremljena je hranjiva podloga koja je sadržavala: 15 g L<sup>-1</sup> glukoze, 1 g L<sup>-1</sup> diamonijevog fosfata, 1 g L<sup>-1</sup> diamonijevog sulfata, te 1,5 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta. Uzgoj inokuluma proveden je u Erlenmeyer tikvicama, a ukupni volumen podloge je iznosio 250 mL.



### **3.1.4.3. Kontrolne hranjive podloge za uzgoj u Erlenmeyer tikvicama**

U radu su korištene dvije različite kontrolne podloge za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama. Hranjiva podloga (1) je sadržavala:  $10 \text{ g L}^{-1}$  glukoze,  $10 \text{ g L}^{-1}$  ksiloze,  $1 \text{ g L}^{-1}$  diamonijevog sulfata,  $1 \text{ g L}^{-1}$  diamonijevog fosfata i  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  kvašćevog ekstrakta. Sastav hranjive podloge (2) je bio:  $10 \text{ g L}^{-1}$  ksiloze,  $1 \text{ g L}^{-1}$  diamonijevog sulfata,  $1 \text{ g L}^{-1}$  diamonijevog fosfata i  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  kvašćevog ekstrakta.

### **3.1.4.4. Hranjive podloge s lignoceluloznim hidrolizatima**

Hidrolizati dobiveni predobradom lignocelulozne sirovine (pšenične slame) korišteni su kao hranjive podloge za uzgoj kvasca i proizvodnju bioetanola. Šećeri oslobođeni tijekom predobrade predstavljali su izvor ugljika za radni mikroorganizam. U svaku podlogu su dodani diamonijev fosfat i diamonijev sulfat (izvor sumpora i fosfora) u koncentraciji od  $1 \text{ g L}^{-1}$ , te kvašćev ekstrakt (izvor aminokiselina, vitamina, ugljikohidrata) u koncentraciji od  $5 \text{ g L}^{-1}$ . Uzgoj je proveden na hidrolizatima pšenične slame predobrađene pri uvjetima: a)  $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 10 minuta b)  $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 1 i 10 minuta i c)  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 5 i 10 minuta..

### **3.1.4.5. Hranjiva podloga za uzgoj u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору**

Za uzgoj *S. cerevisiae* u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору kao izvor ugljika korišten je hidrolizat pšenične slame dobiven predobradom s 0,5 % sumpornom kiselinom pri  $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 10 minuta. U hidrolizat je dodano  $10 \text{ g L}^{-1}$  glukoze,  $2 \text{ g L}^{-1}$  diamonijevog sulfata i  $2 \text{ g L}^{-1}$  diamonijevog fosfata, te  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  kvašćevog ekstrakta.

### **3.1.5. Oprema i aparatura**

#### **3.1.5.1. Mlin čekičar**

Za usitnjavanje lignocelulozne sirovine korišten je mlin čekičar tip NA45 (Slika 10.). Kapacitet mljevenja mlina u zrnju iznosi  $300 \text{ kg h}^{-1}$ , a za mljevenje u klip 250  $\text{kg h}^{-1}$ . Mlin pokreće trofazni motor, a sadrži dvije vrste sita različitih veličina, 12 i 5 mm. Za usitnjavanje pšenične slame korištene u ovom radu primjenjeno je sito veličine 5 mm.



**Slika 10.** Mlin čekičar-tip NA45 (Megamet d.o.o., Nedelišće, Hrvatska)

#### **3.1.5.2. HPLC**

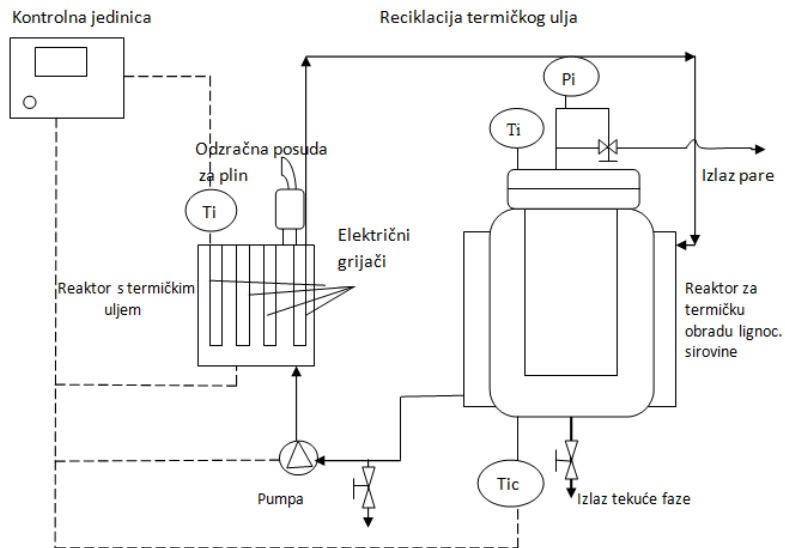
HPLC (Slika 11.) je uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti ( Shimadzu CLASS- VP LC-10A, Shimadzu, Japan). Uređaj se sastoji od crpke (LC-10 ADVP), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10ADVP), uređaja za grijanje kolone (CTO-10AVP), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel H Guard Column, Sigma), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10AVP) i računalnog programa za kromatografiju.



**Slika 11.** HPLC- uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti

### **3.1.5.3. Visokotlačni reaktor za termičku obradu lignoceluloznih sirovina**

Za obradu lignocelulozne sirovine sa sumpornom kiselinom koristio se visokotlačni reaktor prikazan na Slici 12. U reaktoru ukupnog volumena 20 litara nalazi se perforirana košara u koju se stavlja lignocelulozna sirovina. Reaktor se grije preko plašta kroz koji struji termičko ulje koje se grije u odvojenoj posudi uz pomoć tri električna grijača. Integrirana pumpa omogućava strujanje zagrijanog ulja kroz cijeli sustav uz jednolično zagrijavanje smjese preko plašta reaktora. Reaktor sadrži temperaturne sonde za određivanje temperature ulja za grijanje, te temperaturne sonde za određivanje temperature u gornjem i donjem dijelu reaktora i tlaka u gornjem dijelu reaktora (tlak para). Nakon završetka procesa postepeno se ispušta para iz reaktora otvaranjem ventila za paru, a kada se tlak u reaktoru izjednači s atmosferskim tlakom otvara se ventil na dnu reaktora za ispuštanje tekućeg dijela hidrolizata. Čvrsti dio zaostaje u perforiranoj košari koja se može izvaditi nakon otvaranja poklopca reaktora.



**Slika 12.** Shema visokotlačnog reaktor za obradu lignoceluloznih sirovina (Ti- temp. pare/ulja; Pi-tlak pare u reaktoru; Tic- temperatura unutar reaktora)

#### 3.1.5.4. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)

Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor ili skraćeno HRCB, korišten je za proces alkoholne fermentacije na hidrolizatu pšenične slame dobivenom kiselinskom predobradom. HRCB (Slika 13.) se sastoji od cilindrične posude izrađene od nehrđajućeg čelika opremljene sa sustavom za praćenje temperature i tlaka i sustavom za regulaciju rotacije. Ukupan volumen ovog bioreaktora je 30 L, a sterilizacije se vrši direktnom parom.



**Slika 13.** HRCB- Horizontalni Rotirajući Cijevni Bioreaktor

**3.1.5.5. Ostali uređaji**

Uz laboratorijsko posuđe i potrošni laboratorijski materijal u izradi ovoga rada korištena je i oprema navedena u Tablici 3. :

**Tablica 3.** Popis uređaja i proizvođača korištenih u izradi rada

<b>OPREMA</b>	<b>PROIZVOĐAČ</b>
Centrifuga	Harrier 18/80, Sanyo, Velika Britanija ThermoScientific, SL 8R, SAD
Tresilica	RM 71 B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka
Sušionik	Instrumentaria ST-50, Hrvatska
Tehnička vaga	Technica ET-1111, Slovenija
Analitička vaga	Sartorius, Njemačka
Vrtložna mješalica	Technica ET-1111, Slovenija
UV/Vis spektrofotometar	Cary 13E Varian, Mulgrave, Australija
Kvarcne kivete promjera 10 mm	Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka
Oprema za filtraciju otopina	najlonski filter (0,22 $\mu\text{m}$ , 47 mm; Magna, GE Water & Process Technologies, Michigan, SAD
Autoklav	Sutjeska, Beograd, Jugoslavija
Plinski kromatograf CP-3800	Varian Palo Alto, SAD
Mlinac za kavu SCG 3050SS	Sencor, Japan
Hladnjak i zamrzivač	Bosch, Njemačka

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. Predobrada lignocelulozne sirovine**

Kiselinska predobrada prethodno usitnjene pšenične slame sa sumpornom kiselinom provedena je u visokotlačnom reaktoru. U reaktoru je pomiješano 500 g suhe tvari pšenične slame s 10 litara 0,5 %-tne otopine sumporne kiseline koja je pripravljena dodatkom 28,75 mL 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u 9,971 L vodovodne vode. Početni omjer tekućeg dijela (otopina sumporne kiseline) i čvrstog dijela (pšenična slama) bio je 1:20 (g mL<sup>-1</sup>). Predtretmani su provedeni na temperaturama 160 °C, 180 °C i 200 °C uz vrijeme zadržavanja od 1, 5 i 10 minuta, a na temperaturama od 150 °C, 170 °C i 190 °C je ispitivano samo vrijeme zadržavanja od 5 minuta. Nakon postizanja željene temperature predobrade i isteka ispitivanog vremena zadržavanja, ispuštena je para, a zatim su odvojene čvrsta i tekuća faza. Čvrsta i tekuća faza su potom analizirane kako je opisano u Poglavlju 3.2.4. Tekući dio je neutraliziran do neutralnog pH dodatkom kalcijevog hidroksida i takav neutralizirani hidrolizat korišten je za fermentaciju. Čvrsti dio pohranjen je u zamrzivaču.

### **3.2.2. Uzgoj inokuluma**

Kultura kvasca *S. cerevisiae* uzgojena je na podlozi pripremljenoj na način opisan u Poglavlju Materijali (3.1.4.2.). U epruvetu s kosom podlogom na kojoj je uzgojena kultura kvasaca dodano je 10 mL vode, te je kultura sastrugana s površine podloge pomoću mikrobiološke ušice. Suspenzija iz epruvete zatim je dodana u 250 mL hranjive podloge za uzgoj inokuluma u Erlenmeyer tikvici od 500 mL. Inokulum je uzgajan na tresilici pri 140 okretaja po minuti, pri temperaturi od 30 °C preko noći.

### **3.2.3. Uzgoj kvasca *S. cerevisiae* i nadzor procesa alkoholnog vrenja**

#### **3.2.3.1. Proces alkoholne fermentacije u tikvicama**

Podloge korištene za proizvodnju etanola pomoću kvasca *S. cerevisiae* u tikvicama su pripravljene na način opisan u Poglavlju 3.1.4.4. Kontrolne podloge su prije uzgoja

sterilizirane u autoklavu na temperaturi od 121 °C kroz 25 minuta. Uzgoj se provodio u Erlenmeyer tikvicama od 500 mL, a ukupni volumen hranjive podloge je bio 250 mL. U svaku hranjivu podlogu sterilno je dodano 20 mL inokuluma prethodno uzgojenog na podlozi za uzgoj inokuluma (Poglavlje 3.1.4.2.). Na svaku tikvicu stavljena je vrelnača koja je prethodno dezinficirana pomoću etanola i provlačenja kroz plamen. Anaerobni proces alkoholne fermentacije u tikvicama praćen je kroz 24 sata.

### **3.2.3.2. Proces alkoholne fermentacije u reaktoru**

Za uzgoj kvasca *S. cerevisiae* i provedbu procesa alkoholne fermentacije korišten je horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB). Bioreaktor je najprije steriliziran pomoću vruće pare kroz 30 minuta, a potom je u njega dodana hranjiva podloga pripremljena kako je opisano u poglavlju 3.1.4.5. Ukupni volumen hranjive podloge je bio 5000 mL, a hranjiva podloga je inokulirana s 500 mL prethodno uzgojenoga inokuluma. Uzgoj se provodio u anaerobnim uvjetima uz intervalnu rotaciju bioreaktora brzinom 20 okretaja u minuti, kroz 12 minuta u svakom satu uzgoja. Uzgoj je praćen kroz 28 sati.

### **3.2.3.3. Nadzor procesa alkoholnog vrenja**

Kroz prvih 10 sati anaerobnog uzgoja u tikvicama i HRCB-u, uzorci su izuzimani svakih sat vremena, uključujući i nulti sat. Kod uzgoja u tikvicama zadnji je uzorak izuzet 24. sata, a kod uzgoja u HRCB-u proces je praćen izuzimanjem uzoraka od 24. do 28. sata uzgoja. Volumen izuziman iz tikvica je bio 3 mL, a iz reaktora 10 mL. Iz izuzetih uzoraka pripravila su se potrebna razrijeđenja od kojih su prvo i drugo korišteni za mjerenje adsorbancije na 600 nm, a 3., 4. i 5. iskorišteni su za naciepljivanje na sterilne Petrijeve zdjelice s agarom za određivanje ukupnog broja stanica (Poglavlje 3.2.4.7.). Iz originalnih uzoraka pripremljeni su uzorci za analizu HPLC metodom za određivanje preostale koncentracije glukoze i ksiloze te dobivenog etanola. Također je praćena i promjena koncentracije furana mjerenjem apsorbancije na 284 i 320 nm. Kod uzgoja u HRCB-u 7 mL originalnog uzorka je centrifugirano kroz 15 minuta na 4500 min<sup>-1</sup>, kako bi se izdvojila biomasa od hranjive podloge koja je potom stavljena na sušenje radi gravimetrijskog određivanja mase nastale kvašćeve biomase. Metode korištene za nadzor procesa alkoholne fermentacije su opisane u Poglavlju 3.2.4. Analitičke metode.

### **3.2.4. Analitičke metode**

#### **3.2.4.1. Određivanje suhe tvari u lignoceluloznoj sirovini**

Uzorak lignocelulozne sirovine izvagan je i osušen na 100 °C do konstantne mase. Nakon sušenja uzorak je izvagan, te je određen udio suhe tvari prema jednadžbi [1] :

$$w \text{ (s.tv)} = \frac{m \text{ (poslije sušenja)}}{m \text{ (prije sušenja)}} * 100 \text{ [%]} \quad [1]$$

#### **3.2.4.2. Kiselinska hidroliza lignocelulozne sirovine**

Udjel strukturnih ugljikohidrata (glukan, ksilan) te lignina topljivog i netopljivog u kiselini određeni su u izvornoj i predobrađenoj lignoceluloznoj sirovini kiselinskom hidrolizom prema propisu Nacionalnog laboratorija za obnovljive izvore energije (eng. National Renewable Energy Laboratory, NREL; Sluiter i sur., 2010). U epruvetu je dodano po 0,4 g isprane, osušene sirovine (neobrađena ili predobrađena pšenična slama) usitnjene u fini prah pomoću mlinca za kavu. Zatim je dodano 4 mL 72 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i sirovina je ostavljena u termostatu na 30 °C sat vremena uz povremeno miješanje sadržaja. Nakon inkubacije sadržaj iz epruvete kvantitativno je prenesen u tikvicu s okruglim dnom uz dodatak 112 mL demineralizirane vode tako da je koncentracija sumporne kiseline u smjesi nakon dodatka vode iznosila 4 %. Smjesa je zagrijana do vrenja i kuhana kroz 4 sata uz povratno hladilo i povremeno miješanje. Nakon hidrolize uzorci su ohlađeni pod mlazom vode i filtrirani preko Büchnerovog ljevka kroz prethodno osušeni i izvagani filter papir. Zaostali talog ispiran je s vrućom vodom do neutralnog pH. Čvrsti talog zaostao na filter papiru je lignin netopljiv u kiselini čija masa je određena gravimetrijski nakon sušenja. U filtratu kiselinskog hidrolizata određene su koncentracije glukoze i ksiloze HPLC metodom, te je izračunat udjel strukturnih ugljikohidrata glukana i ksilana. Udio lignina topljivog u kiselini u filtratu nakon hidrolize određen je spektrofotometrijski.



### 3.2.4.3. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini

Čvrsti dio sirovine zaostao na filter papiru nakon kiselinske hidrolize osušen je na 105 °C do konstantne mase. Nakon sušenja, talog je izvagan i izračunat je udjel lignina netopljivog u kiselini prema jednadžbi [2].

$$w(\text{LNTK}) = \frac{m(\text{osušeni filter s talogom}) - m(\text{filter})}{m(\text{uzorka uzetog u analizu} = 0,4\text{g})} * 100 [\%] \quad [2]$$

### 3.2.4.4. Udjel lignina topljivog u kiselini (LTK)

U filtratu kiselinskog hidrolizata određen je udjel lignina topljivog u kiselini (eng., acid soluble lignin, ASL) spektrofotometrijski pri valnoj duljini 205 nm. Udjel lignina topljivog u kiselini izračunat je prema jednadžbi [3]:

$$w(\text{LTK}) = \frac{A * D * V}{\alpha * b * m} \quad [3]$$

A= apsorbancija uzorka na 205 nm; D= faktor razrijeđenja = 10; V= volumen filtrata = 0,116 L;  $\alpha$  = konstanta, 110 g L<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>; b = širina kivete, 1 cm; m = masa uzorka uzetog u analizu (0,4 g)

### 3.2.4.5. Određivanje furana spektrofotometrijski

U tekućoj fazi nakon kiselinske predobrade i u uzorcima izuzimanim tijekom uzgoja određivana je koncentracija furana spektrofotometrijski. Za određivanje furana ovom metodom potreban je baždarni pravac koji se prethodno izradi mjerenjem apsorbancije otopina furana poznate koncentracije. Uzorak s nepoznatom koncentracijom furana se razrijeđuje demineraliziranom vodom u omjeru 1:1000 te se mjeri apsorbancija na 284 i 320 nm. Koncentracija se odredi iz sljedeće jednadžbe baždarnog pravca [4]:

$$\gamma_{\text{furani}} = 2,496 * \Delta A + 0,0158 * R^2 \quad [4]$$

#### **3.2.4.6. Određivanje optičke gustoće uzoraka hranjive podloge**

Uzorci izuzeti tijekom uzgoja imali su visoku optičku gustoću ( $A_{600} > 1,5$  AU), pa je bilo potrebno prirediti odgovarajuća razrijeđenja ovih uzoraka. Određeni volumen svakog razrijeđenja ( $V \approx 4$  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 ( $A_{600}$ ). Optička gustoća uzorka izražena je kao razlika apsorbancije uzorka i slijepe probe.

#### **3.2.4.7. Određivanje ukupnog broja živih stanica kvasca**

U sterilnim uvjetima je iz uzoraka izuzimanih tijekom uzgoja pripravljeno 3., 4. i 5. razrijeđenje. Po 0,1 mL tih razrijeđenja naciepljen je na sterilne Petrijeve zdjelice sa sladnom podlogom koje su potom stavljene na inkubaciju kroz 24 sata na 30 °C. Porasle kolonije su izbrojane te je određen ukupan broj živih stanica.

#### **3.2.4.8. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC)**

HPLC metodom analizirani su sljedeći uzorci: tekuća faza dobivena nakon kiselinskog predtretmana lignocelulozne sirovine, filtrat dobiven dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom i uzorci izuzimani tijekom uzgoja. Uzorci su pripremljeni na način opisan u poglavljima 3.2.4.8.1. i 3.2.4.8.2., a za analizu je korišten kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan). U uzorcima su određivane koncentracije ugljikohidrata (glukoze, ksiloze, arabinoze) i etanola. Za pripravu svih otopina korištena je redestilirana voda čija je vodljivost iznosila manje od 1  $\mu$ S. Kao pokretna faza korištena je otopina H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 % vol/vol) u vodi. Po 20  $\mu$ L svakog uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od 55 °C i brzini protoka pokretne faze od 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Podaci su analizirani pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10. Iz jednadžbi baždarnih pravca navedenih u Tablici 4. izračunate su koncentracija monosaharida i etanola u analiziranim uzorcima.

Tablica 4. Retencijska vremena i baždarni pravci

<b>Spoj</b>	<b>T<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Jednadžba baždarnog pravca</b>	<b>R<sup>2</sup> (-)</b>
<b>glukoza</b>	14,045±0,040	A = 226208,50 $\gamma_{glukoza}$ - 1433,13	1,0000
<b>ksiloza</b>	14,834±0,037	A = 223510 $\gamma_{ksiloza}$ + 1070,5	1,0000
<b>arabinoza</b>	16,061±0,034	A = 225152 $\gamma_{arabinoza}$ + 562,39	0,9999
<b>mravlja kiselina</b>	18,520± 0,018	A = 82201 $\gamma_{mravlja\ kiselina}$ - 125,4	0,9983
<b>octena kiselina</b>	19,825±0,026	A = 112445 $\cdot\gamma_{octena\ kiselina}$ + 1276,1	0,9989
<b>levulinska kiselina</b>	21,388±0,051	A = 207915 $\gamma_{levulinska\ kiselina}$ + 3222,5	0,9998
<b>etanol</b>	25,406±0,014	A = 819297 $\varphi_{etanol}$ - 1766,9	0,9992

#### 3.2.4.8.1. Priprema uzorka nakon dvostupanjske kis. hidrolize za analizu HPLC metodom

Filtrat dobiven dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom najprije je neutraliziran dodatkom Ca(OH)<sub>2</sub> do pH vrijednosti od oko 4-5 jedinica. Centrifugiranjem uzorka (5000 g; 5 min; HC-240, Tehtnica, Železniki, Slovenija), dobiven je supernatant koji je zatim profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine 0,22  $\mu$ m (33 mm; Carl Roth, GmbH & Co, Karlsruhe, Njemačka). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10AVP sustava.

#### 3.2.4.8.2. Priprema uzoraka tekuće faze za analizu HPLC metodom

U uzrocima izuzetim tijekom uzgoja i u tekućoj fazi nakon kiselinske predobrade pšenične slame provedeno je taloženje proteina dodatkom 10% otopine cinkovog sulfata heptahidrata u omjeru 1:1 (vol/vol). Uzorci su snažno izmješani tijekom 20-tak sekundi (mikser EV-100, Tehtnica, Železniki, Slovenija) i ostavljeni da odstoje 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Istaloženi proteini i biomasa izdvojeni su centrifugiranjem (10000 g, 5 min; HC-240, Tehtnica, Železniki, Slovenija), a supernatant je profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine 0,2  $\mu$ m (Cromafil®Xtra PA(NY)-20 $\mu$ m/25mm; Machery-Nagel CoKG, Düren, Njemačka). Pripremljeni uzorci su analizirani pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10AVP sustava (Poglavlje 3.2.4.8.)

### 3.2.5. Izračunavanje udjela strukturnih ugljikohidrata

Masa ugljikohidrata (glukan, ksilan) u lignoceluloznoj sirovini izračunata je iz mase odgovarajućih monosaharida (glukoze, ksiloze, arabinoze) u hidrolizatu nakon predobrade i filtratu nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize uz pomoć korektivnog faktora ( $K_f$ ) prema jednadžbi [6]. Korektivni faktor predstavlja omjer molekulske mase monomerne građevne jedinice ugljikohidrata i monosaharida. Korektivni faktor za pentoze (ksiloza i arabinoza) je 0,88 (tj.  $132 \text{ g mol}^{-1}/150 \text{ g/mol}^{-1}$ ), dok je za heksoze (glukoza, galaktoza i manoz) 0,9 (tj.  $162 \text{ g mol}^{-1}/180 \text{ g/mol}^{-1}$ ).

$$m_{\text{CHO}_i} = c_{\text{monosaharida}} \cdot V_{\text{hidr}} \cdot K_f \quad (\text{g}) \quad [6]$$

$V_{\text{hidr}}$  – volumen hidrolizata/filtrata (L);  $c_{\text{monosaharida}}$  – koncentracija monosaharida ( $\text{g L}^{-1}$ );  $K_f$  – korektivni faktor

Udjel strukturnih ugljikohidrata u lignoceluloznoj sirovini izračunava se prema jednadžbi [7]:

$$w_{\text{CHO}} = \frac{m_{\text{CHO}}}{m_{\text{uz}} w_{\text{H}_2\text{O},X}} \quad (\text{g g}^{-1}) \quad [7]$$

$w_{\text{CHO}}$  – udjel ugljikohidrata (% , masa masa<sup>-1</sup>);  $m_{\text{CHO}}$  – masa ugljikohidrata u predobrađenoj lignoceluloznoj sirovini (LCS) (g);  $w_{\text{H}_2\text{O},X}$ -udjel vlage u predobrađenoj LCS ;  $m_{\text{uz}}$  – masa predobrađene LCS podvrgnute predobradi / kiselinskoj hidrolizi (0,4 g)

### 3.2.6. Izračunavanje iskorištenja glukana, ksilana i ukupnog lignina u lignoceluloznoj sirovini

Nakon predobrade pšenične slame izračunato je iskorištenje glukana, ksilana i ukupnog lignina za svaki pojedini uvjet predobrade prema jednadžbi [8] :

$$\eta = \frac{m_{\text{FK}} * w_{\text{H}_2\text{O}/\text{FK}} * w_{\text{X}/\text{PKO}}}{m_{\text{KO}} * w_{\text{H}_2\text{O}/\text{KO}} * w_{\text{X}/\text{KO}}} * 100 \quad [8]$$

$m_{\text{FK}}$ -masa vlažnog filtarskog kolača (g);  $w_{\text{H}_2\text{O}/\text{FK}}$  -udjel vlage u filtarskom kolaču;  $m_{\text{KO}}$ -masa pšenične slame za predobradu (g);  $w_{\text{H}_2\text{O}/\text{KO}}$ -udjel vlage u pšeničnoj slami;  $w_{\text{X}/\text{KO}}$ -udjel polimera (glukan, ksilan, ukupni lignin) u pšeničnoj slami;  $w_{\text{X}/\text{pKO}}$ -udjel polimera (glukan, ksilan, ukupni lignin) u predobrađenoj pšeničnoj slami

### 3.2.7. Izračunavanje pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje etanola

#### 3.2.7.1. Potrošnja supstrata ( $\Delta S$ )

$$\Delta S = S_0 - S \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [9]$$

$S_0$ - početna koncentracija supstrata [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $S$ - konačna koncentracija supstrata [ $\text{g L}^{-1}$ ]

#### 3.2.7.2. Prinos produkta ( $Y_p$ )

$$Y_p = P - P_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [10]$$

$P_0$  – početna koncentracija produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $P$ - konačna koncentracija produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ]

#### 3.2.7.3. Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ( $Y_{p/s}$ )

$$Y_{p/s} = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Y_p}{\Delta S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [12]$$

$S_0, P_0$  - početna koncentracija supstrata, odnosno produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $S, P$  - konačna koncentracija supstrata, odnosno produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ]

#### 3.2.7.4. Produktivnost ( $Pr$ )

$$Pr = \frac{Y_X \text{ ili } Y_P}{t_u} \quad [\text{kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}] \quad [17]$$

$Y_X$  - prinos biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $Y_P$ - prinos produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ];  $t_u$ - ukupno vrijeme bioprocesa [h]

## **REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Kao lignocelulozna sirovina u ovom radu korištena je pšenična slama kojoj je sastav određen dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom, a prikazan je u Poglavlju 4.1. Da bi se ispitao utjecaj temperature na uspješnost procesa predobrade pšenične slame s 0,5 %-tnom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru, provelo se istraživanje utjecaja 5 različitih temperatura (150 °C, 160 °C, 170 °C, 180 °C, 190 °C i 200 °C) na proces uz konstantno vrijeme zadržavanja od 5 minuta. Nakon provedenog istraživanja utjecaja temperature na uspješnost procesa, iz dobivenih rezultata odabrane su tri temperature (160 °C, 180 °C i 200 °C) za daljnje istraživanje utjecaja vremena zadržavanja na proces predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru (Poglavlje 4.2.). U tu svrhu provedeni su još i procesi predobrade pšenične slame uz vremena zadržavanja od 1 i 10 minuta na tri odabrane temperature. Tekuća faza dobivena kiselinskom predobradom pšenične slame nakon neutralizacije, korištena je kao podloga za proizvodnju etanola mikrobnom fermentacijom pomoću dva odabrana soja kvasca *S. cerevisiae*.

Dva soja kvasca *Sacharomyces cerevisiae*: (1) divlji soj i (2) soj Y9, korišteni su kao radni mikroorganizmi u procesu proizvodnje etanola na hidrolizatima pšenične slame. Sposobnost rasta odabranih sojeva te mogućnost sinteze etanola tijekom mikrobne fermentacije na tekućem dijelu dobivenom nakon kiselinske predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru prvo se testirala u manjem mjerilu, točnije u Erlenmeyerovim tikvicama (250 mL). Rezultati su prikazani u Poglavlju 4.3. Sirovina dobivena predobradom pšenične slame u visokotlačnom reaktoru, osim hesoza (glukoza) također sadrži i pentoze (ksiloza) (sastav sirovine prikazan u Poglavlju 4.1.). Stoga je bilo važno istražiti mogućnost rasta odabranog soja kvasca *S. cerevisiae* Y9 u hranjivim podlogama sličnog sastava kao i hidrolizati dobiveni predobradom pšenične slame. U tu svrhu proveo se anaerobni uzgoj *S. cerevisiae* soj Y9 na kontrolnim podlogama koje su sadržavale glukozu i ksilozu i samo ksilozu, a rezultati su prikazani u Poglavlju 4.3. Na osnovi rezultata dobivenih uzgojem u Erlenmeyer tikvicama, pokazano je da odabrani soj kvasca *S. cerevisiae* Y9 može proizvoditi etanol na hidrolizatima dobivenim predobradom pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pomoću sumporne kiseline. Stoga je odabran hidrolizat pšenične slame na kojem je proveden najuspješniji proces proizvodnje etanola tijekom uzgoja u Erlenmeyer tikvicama (hidrolizat predobrađen na 180 °C uz vrijeme zadržavanja od 10 minuta) kako bi se proces proveo u većem mjerilu, u horizontalnom rotirajućem cijevnom reaktoru (HRCB). Rezultati su prikazani u Poglavlju 4.4.

#### **4.1. Ispitivanje utjecaja temperature na uspješnosti kiselinske predobrade pšenične slame sumpornom kiselinom**

U ovom poglavlju prikazani su rezultati dvostupanjske kiselinske hidrolize pšenične slame (Poglavlje 3.2.4.1., Materijali i metode). Analizom dobivenog hidrolizata pomoću visoko učinkovite tekućinske kromatografije (Poglavlje 3.2.4.8., Materijali i metode) određen je udio strukturnih ugljikohidrata u sirovini (Poglavlje 3.2.5., Materijali i metode) te je obradom rezultata dobiven sastav sirovine korištene u daljnjem istraživanju. Rezultati su prikazani u Tablici 5. Sastavi tekućih faza dobivenih nakon predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru (Poglavlje 3.2.1., Materijali i metode) uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta i različitim temperaturama od 150 do 200 °C prikazani su u Tablici 6.

**Tablica 5.** Sastav pšenične slame

<b>sirovina</b>	<b><math>w_{\text{glukan}}</math></b>	<b><math>w_{\text{ksilan}}</math></b>	<b><math>w_{\text{arabinan}}</math></b>	<b><math>w_{\text{LTK}}</math></b>	<b><math>w_{\text{NTLK+pepeo}}</math></b>	<b><math>w_{\text{HAc}}</math></b>	<b><math>w_{\text{mravlja kis.}}</math></b>
	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
<b>pšenična slama</b>	51,93	21,06	5,12	0,24	15,88	3,04	2,21

Kao lignocelulozna sirovina u ovom radu korištena je pšenična slama. Pšenična slama ima veliki potencijal za primjenu u proizvodnji bioetanol. Naime, godišnje tijekom proizvodnje pšenice (2012. je iznosila 670 milijuna tona) oko 400 milijuna tona otpada ostaje neiskorišteno, a moglo bi se iskoristiti kao sirovina za proizvodnju etanola (Tishler i sur., 2015). Pšenična slama prema literaturnim podacima sadržava: 35-45% celuloze, 20-30% hemiceluloze i 15 % lignina (Saha i sur., 2005). Prema radu autora Khan i Mubeen, sastav pšenične slame je nešto drugačiji te ona sadržava od 33,7% do 40% glukana u suhoj tvari, te od 21 do 26% ksilana i arabinana izraženih kao hemiceluloza (Khan i Mubeen, 2012). Naime, sastav pšenične slame ovisi o korištenoj sorti, klimatskom pojasu njenog uzgoja te o analitičkim metodama korištenim za određivanje njenog sastava. To su i mogući razlozi odstupanja sastava analizirane slame od literaturnih podataka. Sastav pšenične slame korištene u ovom istraživanju određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Prema dobivenim rezultatima izračunati su udjeli ugljikohidratnih polimera, udio ukupnog lignina, te udio octene i mravlje kiseline koji su prikazani u Tablici 5. Udio glukana u analiziranoj pšeničnoj slami (51,93 %) nešto je veći od udjela navedenih u literaturi, dok su udjeli ksilana (21,06 %) i arabinana (5,12



%) u skladu s literaturnim navodima. Udjel ukupnog lignina iznosi 16,12 % što je također u skladu s literaturnim podacima (Saha i sur., 2005; Khan i Mubeen, 2012; Boe i sur., 2007).

Kako bi se pšenična slama mogla koristiti kao sirovina za proizvodnju etanola potrebno je provesti predobradu da bi se ugljikohidratni polimeri preveli u fermentabilne šećere. Jedna od najčešće istraživanih metoda predobrade je predobrada razrijeđenom kiselinom (Zhu i sur., 2009). U ovom radu je kao katalizator za hidrolizu pšenične slame korištena sumporna kiselina, jedna od najčešće korištenih kiselina za predobradu lignocelulozne sirovine (Lenihan i sur., 2009; Zhu i sur., 2009). Uvjeti predobrade odabrani su na temelju prethodno provedenih istraživanja u sklopu projekta *"Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina"* pod vodstvom prof. Božidara Šanteka u okviru kojeg je rađen i ovaj diplomski rad. U prethodno provedenim istraživanjima predobrade kukuruznih oklasaka i kukuruzovine sumpornom kiselinom najveća efikasnost procesa ostvarena je kod vremena zadržavanja od 5 minuta uz primjenu 1% sumporne kiseline na temperaturi od 210 °C (Govedarica, 2016; Lauder, 2016). Također se pokazalo da smanjenje koncentracije sumporne kiseline s 1% na 0,5% rezultira značajnim smanjenjem koncentracije nusproizvoda procesa kao što su levulinska i mravlja kiselina (Govedarica, 2016). Iz tih razloga za predobradu pšenične slame u ovom istraživanju korištena je 0,5 % sumporna kiselina, te je za ispitivanje utjecaja temperature na uspješnost procesa predobrade primjenjeno vrijeme zadržavanja od 5 minuta. Procesu su provedeni pri 6 različitih temperatura: 150 °C, 160 °C, 170 °C, 180 °C, 190 °C i 200 °C. Nakon provedene predobrade u tekućoj fazi određena je koncentracija šećera glukoze, ksiloze i arabinoze, te koncentracija nusprodukata: octene, mravlje i levulinske kiseline i ukupnih furana. Sastavi tekućih faza dobivenih predobradom pšenične slame prikazani su u Tablici 6.

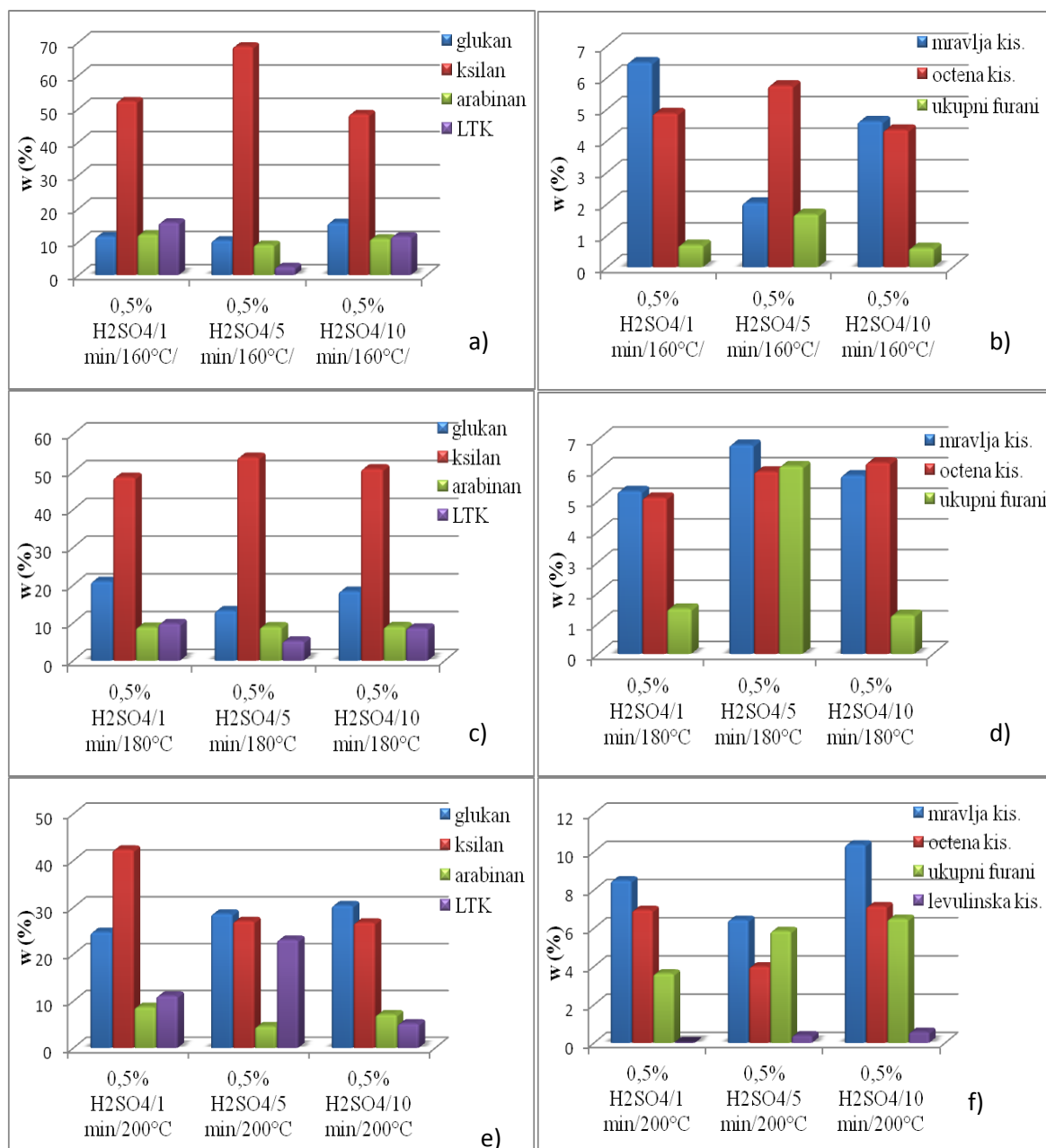
**Tablica 6.** Sastavi tekućih faza dobivenih nakon predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta i različitim temperaturama

Uvjeti predobrade*	$\gamma_{\text{glukoza}}$ [ g L <sup>-1</sup> ]	$\gamma_{\text{ksiloza}}$ [ g L <sup>-1</sup> ]	$\gamma_{\text{arabinoza}}$ [ g L <sup>-1</sup> ]	$\gamma_{\text{mravlja kis.}}$ [ g L <sup>-1</sup> ]	$\gamma_{\text{octena kis.}}$ [ g L <sup>-1</sup> ]	$\gamma_{\text{levulinska kis.}}$ [ g L <sup>-1</sup> ]	$\gamma_{\text{furani}}$ [ mg L <sup>-1</sup> ]	<i>wLTK</i> (%)
<b>0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ 150°C/5 min</b>	1,5094	9,1211	1,3164	0,2429	0,3368	0	187,5	0,4972
<b>0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ 160°C/5 min</b>	1,9225	13,0154	1,6827	0,3385	0,9567	0	278,446	0,4949
<b>0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ 170°C/5 min</b>	2,6938	10,9933	1,4381	0,4702	0,8506	0	558,494	0,9516
<b>0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ 180°C/5 min</b>	2,1691	9,0804	1,4711	1,0101	0,8802	0	906,651	0,8224
<b>0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ 190°C/5 min</b>	3,8056	7,3808	1,3887	1,2208	1,0274	0,0550	1001,6	0,9695
<b>0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ 200°C/5 min</b>	4,7257	4,5879	0,7585	0,9556	0,5925	0,0580	868,990	1,6447

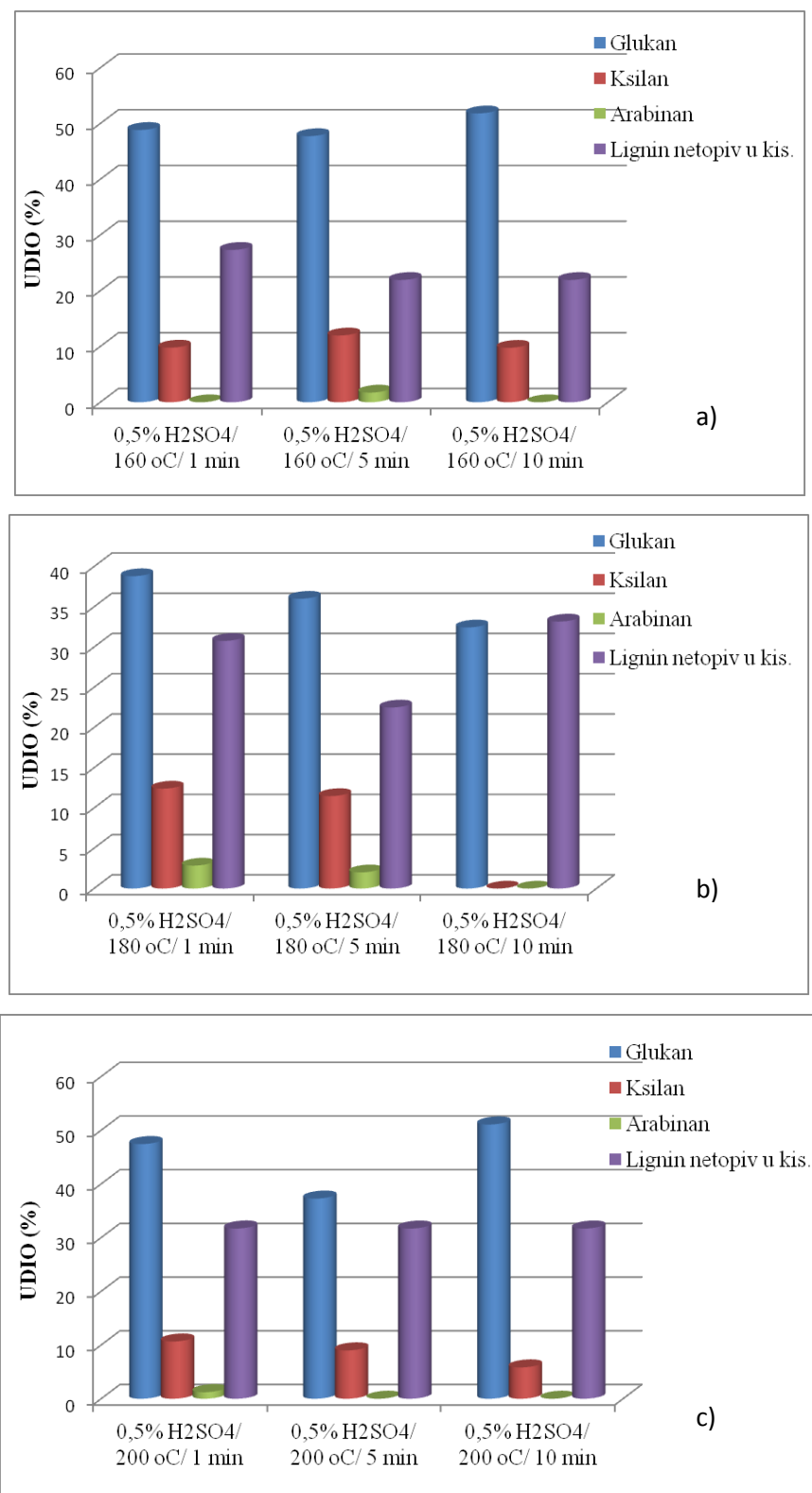
Iz rezultata sastava tekuće faze nakon kiselinske predobrade pšenične slame vidljivo je kako je koncentracija ksiloze veća od koncentracije glukoze i arabinoze za sve primjenjene uvjete predobrade. To je u skladu s literaturom gdje se navodi kako tijekom predobrade razrijeđenom kiselinom većinom dolazi do razgradnje hemicelulozne frakcije lignocelulozne sirovine budući da se ona lakše hidrolizira od celuloze (Lenihan i sur., 2009; Zhang i Hu, 2014). Chandel i sur., navode kako je hidroliza razrijeđenom kiselinom jednostavna i brza metoda za dobivanje hemiceluloznog hidrolizata (Chandel i sur., 2012). Najviša koncentracija ksiloze koja iznosi  $13,0154 \text{ g L}^{-1}$  određena je pri temperaturi predobrade od  $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , te je primjećen pad koncentracije ksiloze s daljnim povećanjem temperature. Suprotan trend primjećen je s koncentracijom glukoze koja s porastom temperature poprima veće vrijednosti. Tako je najveća koncentracija glukoze od  $4,7257 \text{ g L}^{-1}$  zabilježena na najvišoj primjenjenoj temperaturi, odnosno  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . I ova pojava je u skladu s literaturom gdje je zabilježeno kako više temperature tijekom kiselinske hidrolize pogoduju hidrolizi celuloze (Saha i sur., 2002; Sun i Cheng, 2001). Iz Tablice 6. je također vidljivo kako s porastom temperature dolazi i do porasta koncentracije furana. Zamijećeni trendovi u promjeni koncentracije ksiloze i inhibitora u skladu su s literaturom gdje se navodi kako je temperatura ključni faktor koji utječe na degradaciju šećera u inhibitore, te više primjenjene temperature rezultiraju većim koncentracijama inhibitora (Chandel i sur., 2012). Dehidracijom iz pentoza nastaje hidroksimetilfurfural (HMF), a iz heksoza furfural (Lenihan i sur. 2009). Osim toga, pri temperaturama predobrade od  $190 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$  došlo je do nastajanja levulinske kiseline koja nije detektirana pri nižim temperaturama, što objašnjavaju literaturni navodi kako ta kiselina nastaje u ekstremnim uvjetima visoke temperature ili dugog vremena zadržavanja razgradnjom HMF-a (Jönsson i Martin, 2015). Koncentracija octene kiseline kretala se u rasponu od  $0,3368 \text{ g L}^{-1}$  do  $1,0274 \text{ g L}^{-1}$ , a koncentracija mravlje kiseline u rasponu od  $0,2429 \text{ g L}^{-1}$  do  $1,2208 \text{ g L}^{-1}$ . Udio lignina topivog u kiselini raste s porastom temperature, te je pri  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$  iznosio  $1,6447 \%$ . Na temelju ovih rezultata odabran je raspon temperature od  $160$  do  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$  za ispitivanje utjecaja vremena zadržavanja na proces predobrade lignocelulozne sirovine.

#### 4.2. Ispitivanje utjecaja vremena zadržavanja ( $t_z$ ) na uspješnost procesa predobrade lignocelulozne sirovine

U ovom poglavlju prikazani su rezultati kiselinske predobrade pšenične slame na različitim temperaturama i različitim vremenima zadržavanja (1, 5 i 10 minuta). Dobivene faze, tekuća i čvrsta faza, analizirani su analogno postupcima opisanim u Poglavljima 3.2.4.1 - 3.2.4.8. (Materijali i metode). Rezultati su prikazani na Slikama 14 i 15.



**Slika 14.** Maseni udjeli glukana, ksilana, arabinana, lignina topivog u kiselini (LTK), mravlje, octene i levulinske kiseline te ukupnih furana u tekućoj fazi nakon predobrade pšenične slame s 0,5% sumpornom kiselinom na: a) i b) 160 °C kroz 1/5/10 minuta; c) i d) 180 °C kroz 1/5/10 minuta; e) i f) 200 °C kroz 1/5/10 minuta.



**Slika 15.** Maseni udjeli glukana, ksilana, arabinana i lignina netopivog u kiselini u čvrstoj fazi (predobrađenoj pšeničnoj slami) nakon predobrađe pšenične slame s 0,5% sumpornom kiselinom na: a) 160 °C kroz 1/5/10 minuta; b) 180 °C kroz 1/5/10 minuta; c) 200 °C kroz 1/5/10 minuta.

Za ispitivanje utjecaja vremena zadržavanja na uspješnosti procesa predobrade pšenične slame odabran je temperaturni interval od 160 °C do 200 °C. Za provedbu procesa odabrane su krajnje temperature intervala odnosno 160 °C i 200 °C, te srednja temperatura od 180 °C. Za svaku temperaturu procesi su provedeni pri tri različita vremena zadržavanja: 1, 5 i 10 minuta. I u ovom istraživanju korištena je 0,5% sumporna kiselina. U skladu s prethodno dobivenim rezultatima za predobradu pšenične slame uz vrijeme zadržavanja od 5 min koncentracija ksiloze je i na vremenima zadržavanja od 1 i 10 minuta za sve temperature predobrade bila veća od koncentracije glukoze i arabinoze. Prilikom predobrade na temperaturi od 160 °C najveća koncentracija ksiloze dobivena je za vrijeme zadržavanja od 5 minuta i iznosila je 13,02 g L<sup>-1</sup>, a to odgovara masenom udjelu ksilana od 68,64 % (Slika 14. a). S povećanjem vremena zadržavanja na 10 minuta, koncentracija ksiloze se smanjila i iznosi 7,64 g L<sup>-1</sup>. Maseni udio ksiloze u ukupnoj masi u tekućoj fazi nakon predobrade, za te uvjete iznosi 52,25 % (Slika 14. a). Kod predobrade na temperaturi od 180 °C koncentracija ksiloze za vrijeme zadržavanja od 5 minuta je iznosila 9,06 g L<sup>-1</sup>, a za vrijeme zadržavanja od 10 minuta koncentracija je bila neznatno veća i iznosila je 9,96 g L<sup>-1</sup>. No maseni udio ksilana je s povećanjem vremena zadržavanja s 5 na 10 minuta smanjen s 53,82 % na 50,75 %. Kod predobrade na temperaturi od 200 °C koncentracija ksiloze je s porastom vremena zadržavanja opadala i najmanju vrijednost od 4,35 g L<sup>-1</sup> poprima za vrijeme zadržavanja od 10 minuta. Neznatno veća koncentracija ksiloze za istu temperaturu dobivena je kod vremena zadržavanja od 5 minuta gdje je iznosila 4,57 g L<sup>-1</sup>. Kao što je već rečeno u prethodnom poglavlju, smanjenje koncentracije ksiloze na višim temperaturama rezultat je njene degradacije u inhibitore (HMF). Pad koncentracije ksiloze s povećanjem vremena zadržavanja je također u skladu s literaturnim podacima. U radu autora Djioleu i Carrie navodi se kako koncentracija ksiloze opada ne samo s porastom temperature, već i s povećanjem vremena zadržavanja (s 10 na 20 minuta) pri čemu dolazi do smanjenja njene koncentracije s 13,9 g L<sup>-1</sup> na gotovo 0 g L<sup>-1</sup> (Djioleu i Carrie, 2016). To je pripisano degradaciji ksiloze u hidrosimetilfurfural. Najviše koncentracije furana (hidroksimetilfurfural i furfural) su za temperature predobrade od 160 °C i 180 °C dobivene uz vrijeme zadržavanja 5 minuta. Očekivano je kako će povećanjem vremena zadržavanja na 10 minuta koncentracija furana uslijed razgradnje ksiloze i glukoze biti još veća, no rezultati pokazuju pad njihove koncentracije. Za 160 °C je s povećanjem vremena zadržavanja s 5 na 10 minuta koncentracija smanjena za 72,23 % (s 278,45 mg L<sup>-1</sup> na 77,32 mg L<sup>-1</sup>), a za temperaturu od 180 °C za 75,17 % (s 906,65 na 225,16 mg L<sup>-1</sup>). Na Slici 14. vidljivo je smanjenje masenog udjela furana s povećanjem vremena zadržavanja za navedene temperature predobrade.

Literatura navodi kako u ekstremnim uvjetima kao što su visoka temperatura, ali i duže vrijeme zadržavanja dolazi do razgradnje HMF-a i furfurala u levulinsku i mravlju kiselinu (Jönsson i Martin, 2015; Djiroleu i Carrie, 2016). To je i moguće objašnjenje primijećenog trenda promjene koncentracije ukupnih furana budući da je s povećanjem vremena zadržavanja došlo do povećanja koncentracije mravlje kiseline za sve primjenjene temperature predobrade. Najveća koncentracija mravlje kiseline zabilježena je pri vremenu zadržavanja od 10 minuta i iznosila je  $0,59 \text{ g L}^{-1}$  za temperaturu od  $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $1,01 \text{ g L}^{-1}$  za temperaturu od  $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i za  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$  iznosila je  $1,49 \text{ g L}^{-1}$ . Iz ovoga je također vidljivo kako koncentracija mravlje kiseline te njen maseni udio u masi tekuće faze nakon predobrade se povećava i s povećanjem temperature. Najveći maseni udio mravlje kiseline iznosio je  $10,37 \%$ , a postignut je pri uvjetima od  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t_z$  od 10 minuta (Slika 14. f)). Osim toga, na najvišoj temperaturi predobrade od  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$  detektirana je i levulinska kiselina. Njena koncentracija je kod vremena zadržavanja od 5 minuta iznosila  $0,06 \text{ g L}^{-1}$  (maseni udio u tek. fazi =  $0,39 \%$ ), a maksimalna koncentracija je postignuta na vremenu zadržavanja od 10 minuta i iznosila je  $0,08 \text{ g L}^{-1}$  (maseni udio u tek. fazi =  $0,57 \%$ ). Na ostalim primjenjenim uvjetima predobrade analizom sastava dobivene tekuće faze nije utvrđeno prisustvo levulinske kiseline te stoga njen maseni udio nije prikazan na Slici 14. osim za predobradu na  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Iako primjena viših temperatura rezultira manjom koncentracijom furana, viša temperatura dovodi i do manje ukupne količine šećera u hidrolizatu. Najveća ukupna masa šećera (glukoza, ksiloza i arabinoza) je postignuta prilikom predobrade na  $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$  uz vrijeme zadržavanja od 10 minuta i iznosila je  $93,93 \text{ g}$  (koncentracija- $15,2 \text{ g L}^{-1}$ ). Daljnje povećanje temperature na  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$  daje najveću masu šećera od  $79,67 \text{ g}$  (koncentracija- $13,28 \text{ g L}^{-1}$ ) koja je postignuta kod vremena zadržavanja od 1 minute. Stoga je potrebno pronaći uvjete u kojima će se postići adekvatan omjer šećera i inhibitora kako bi proizvodnja etanola bila što uspješnija, uz što manju inhibiciju radnog mikroorganizma. Budući da octena kiselina nastaje hidrolizom acetilnih grupa hemiceluloze, očekivano je da će najveća količina octene kiseline nastati u uvjetima u kojima je nastalo i najviše ksilana. Iz sastava sirovine proizlazi kako u  $500 \text{ g}$  suhe tvari ima  $105,3 \text{ g}$  ksilana ( $21,06 \%$ ) (Tablica 5.). Najveća masa ksilana u tekućoj fazi nakon predobrade na  $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$  iznosila je  $69,64 \text{ g}$ , a postignuta kod vremena zadržavanja od 5 minuta. Pri tom vremenu zadržavanja je također postignuta i najveća koncentracija octene kiseline od  $0,96 \text{ g L}^{-1}$  (koncentracija je za  $t_z=1$  minutu iznosila  $0,43 \text{ g L}^{-1}$ , a za  $t_z=10$  min  $0,56 \text{ g L}^{-1}$ ) i najveća vrijednost masenog udjela octene kiseline od  $5,74 \%$ . Najveća masa ksilana u tekućoj fazi nakon predobrade na temperaturi od  $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$  je postignuta za vrijeme zadržavanja od 10 minuta ( $54,15 \text{ g}$ ), te je tu postignuta i maksimalna konc. octene kiseline od

## Rezultati i rasprava

1,08 g L<sup>-1</sup> ( koncentracija je za  $t_z=1$  minutu iznosila 0,77 g L<sup>-1</sup>, a za  $t_z= 5$  min 0,88 g L<sup>-1</sup>) i najveći maseni udio octene kiseline u tekućoj fazi od 6,23 %. Kod predobrade na temperaturi od 200 °C najveća masa ksilana dobivena je za vrijeme zadržavanja od 1 minute, a tu je zapažena i najveća koncentracija octene kiseline od 1,08 g L<sup>-1</sup> ( koncentracija je za  $t_z=5$  minutu iznosila 0,59 g L<sup>-1</sup>, a za  $t_z= 10$  min 1,02 g L<sup>-1</sup>). Kod temperature predobrade od 200 °C najveći maseni udio octene kiseline je dobiven kod vremena zadržavanja od 10 minuta i iznosi 7,14 %, te je nešto veći od udjela dobivenog kod vremena zadržavanja od 1 minute gdje iznosi 6,95 %. Uz ksilozu drugi najzastupljeniji fermentabilni šećer prisutan u tekućoj fazi nakon kiselinske predobrade pšenične slame je glukoza. Već je u prethodnom poglavlju navedeno kako koncentracija glukoze raste s porastom temperature, a takvi rezultati su dobiveni i u ovom eksperimentu za sva vremena zadržavanja. Osim toga, na svakoj pojedinoj temperaturi je primjećeno povećanje koncentracije glukoze s povećanjem vremena zadržavanja što je također u skladu s literaturom. U radu Djioleu i Carrie navodi se kako je predobradom na 180 °C došlo do porasta koncentracije glukoze s 1,5 na 11,2 g L<sup>-1</sup> s povećanjem vremena zadržavanja s 10 na 30 minuta. Tako su maksimalne koncentracije glukoze u ovom radu postignute kod vremena zadržavanja od 10 minuta i iznosile su: 2,24 g L<sup>-1</sup> za 160 °C, 3,52 g L<sup>-1</sup> za 180 °C i 4, 84 g L<sup>-1</sup> za 200 °C. Na temperaturi od 200 °C je postignut najveći maseni udio glukana u tekućoj fazi nakon predobrade i on je iznosio 30,42 %. Povećanje masenog udjela glukana u tekućoj fazi s povećanjem vremena zadržavanja također objašnjava zašto je kod predobrade na 180 °C s vremenom zadržavanja od 10 minuta unatoč većoj koncentraciji ksiloze u tekućoj fazi, došlo do blagog pada masenog udjela ksilana u istoj. Osim glukoze i ksiloze u hidrolizatima dobivenim predobradom pšenične slame prisutna je u malim koncentracijama i arabinoza. Koncentracije arabinoze i maseni udjeli arabinana u tekućoj fazi neznatno su varirali s promjenom vremena zadržavanja pri svim temperaturama. Pri temperaturi od 160 °C koncentracija je varirala od 1,20 do 1,68 g L<sup>-1</sup>, a najveća koncentracija je određena za vrijeme zadržavanja od 5 minuta. Najveći maseni udio arabinana za temperaturu od 160 °C je određen za vrijeme zadržavanja od 1 minutu i iznosio je 12,21 %. Objašnjenje za neslaganje maksimalne koncentracije i maksimalnog masenog udjela arabinana pri predtretmanima na 160 °C je u tome što je na nižoj temperaturi s povećanjem vremena zadržavanja značajnija promjena u koncentraciji suhe tvari u hidrolizatu. Povećanjem vremena zadržavanja s 1 na 5 minuta masa u tekućoj fazi se povećala s 58,78 g na 101,63 g (odnosno postotak mase suhe tvari orig. sirovine u tekućoj fazi je povećan s 11 % na 20 %) . Maseni udio se računa kao omjer mase arabinana i ukupne mase u hidrolizatu i budući da je koncentracija arabinoze neznatno varirala njen udio je veći na



kraćem vremenu zadržavanja gdje je ukupna masa manja. Kod viših temperatura promjene u ukupnoj masi komponenata u hidrolizatu nisu bile toliko izražene kao na 160 °C (postotak mase suhe tvari sirovine koji je otpušten u tekuću fazu se kretao u rasponu od 15 % do 20 %). Najveća koncentracija arabinoze od 1,72 g L<sup>-1</sup> i maseni udio arabinana od 8,93 % su postignuti na temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 10 minuta. Koncentracija arabinoze od 1,51 g L<sup>-1</sup> kao i maseni udio od 8,72 % su maksimalne vrijednosti postignute na 200 °C i to na vremenu zadržavanja od 1 minutu.

Dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom krutog dijela dobivenog nakon predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pomoću sumporne kiseline (poglavlje 3.2.4.2., Materijali i metode) utvrđen je njen sastav nakon predobrade. Rezultati su prikazani na Slici 15. Najveći udio u ukupnoj masi predobrađene pšenične slame na svim primjenjenim uvjetima predobrade otpada na glukana. To je u skladu s literaturnim navodima prema kojima se kiselinskom predobrađom uglavnom degradira hemiceluloza (Lenihan i sur., 2009; Zhang i Hu, 2014; Chandel i sur., 2012). Unatoč većoj količini glukana u tekućoj fazi nakon predobrade s povećanjem vremena zadržavanja, udio glukana u predobrađenoj pšeničnoj slami također se povećava s povećanjem vremena zadržavanja. Razlog tomu je što s dužim vremenom zadržavanja dolazi i do veće razgradnje hemiceluloze, te se posljedično tome udio glukana u obrađenoj sirovini povećava. Najveći udio glukana u pšeničnoj slami predobrađenoj sumpornom kiselinom postignut je pri uvjetima od 160 °C i vremenu zadržavanja od 10 minuta te iznosi 51,82 % (Slika 15. a). Taj udio je vrlo sličan udjelu glukana u neobrađenoj pšeničnoj slami koji iznosi 51,93 % (Tablica 5.), što upućuje kako se glukana nije razgradio tijekom predobrade. No budući da je pri tim uvjetima u tekućoj fazi određen glukana u masenom udjelu od 15,67 % upućuje na to da se zapravo radi o prividnom povećanju udjela glukana zbog značajne razgradnje hemiceluloze koja rezultira masenim udjelom ksilana u predobrađenoj slami od 9,77 %. Time je udio ksilana smanjen za više od 50 % početne vrijednosti, budući da udio istog u neobrađenoj sirovini iznosi 21,06 % (Tablica 5.). Također je udio ukupnog lignina u slami predobrađenoj pri navedenim uvjetima prividno povećan s 16,12 % (originalna sirovina) na 22,17 %. Kod predobrade pšenične slame na 180 °C najveći maseni udio glukana je ostvaren kod vremena zadržavanja od 1 minute i iznosi 38,82 %. Nešto manji udio glukana od 32,45 % je postignut s vremenom zadržavanja od 10 minuta, pri kojem je maseni udio ksilana iznosio 0 % (Slika 15. b). To je u skladu s sastavom tekuće faze u kojoj je u ovim uvjetima predobrade dobivena najveća količina šećera (21,73 g glukoze i 61,54 g ksiloze i 10,66 g arabinoze). U slami predobrađenoj na 180 °C je također

došlo do prividnog povećanja udjela lignina koji se kretao od 31 do 33,39 %. Predobradom na 200 °C maseni udio glukana je varirao u rasponu od 47,42 % do 51,07 %, a maksimalna vrijednost je postignuta s vremenom zadržavanja od 10 minuta. Pri istom vremenu zadržavanja postignut je i najmanji maseni udio ksilana od 5,83 % za temperaturu predobrade od 200 °C. Maseni udio ukupnog lignina na 200 °C je iznosio 31,92 % za sva tri vremena zadržavanja. Budući da u pšeničnoj slami predobrađenoj kiselinom zaostaju znatne količine glukana, takva predobrađena sirovina bi se mogla iskoristiti za enzimsku hidrolizu kako bi se sirovina maksimalno iskoristila. Sastavi kiselinom predobrađene pšenične slame su u skladu s literaturom u kojoj se navodi kako se razgradnjom hemiceluloze kiselinskom predobradom degradira lignocelulozna struktura (Zhu i sur., 2009) što rezultira povećanom dostupnošću celuloze enzimima i posljedično tome povećanom razgradljivošću sirovine (Chandel i sur., 2012; Zhang i Hu, 2014). Na temelju rezultata sastava hidrolizata dobivenih predobradom pšenične slame odabrani su hidrolizati koji će se koristiti za uzgoj kvasca *S. cerevisiae* i proizvodnju etanola. Za uzgoj divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* odabrani su hidrolizati dobiveni predobradom s 0,5 % sumpornom kiselinom na 180 °C kroz 1 minutu (23,64 g glukoze i 56,00 g ksiloze) i 200 °C kroz 5 minuta (22,68 g glukoze i 21,93 g ksiloze). Za uzgoj kvasca *S. cerevisiae* soj Y9 odabrani su hidrolizati dobiveni predobradom pšenične slame s 0,5 % sumpornom kiselinom uz vrijeme zadržavanja od 10 minuta na 160 °C (13,22 g glukoze i 45,05 g ksiloze), 180 °C (21,73 g glukoze i 61,54 g ksiloze) i 200 °C (27,80 g glukoze i 25,00 g ksiloze).

#### **4.3. Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* i proizvodnja etanola na hidrolizatima dobivenim kiselinskom predobradom pšenične slame u Erlenmeyerovim tikvicama**

U ovom dijelu istraživanja proučavan je anaeroban uzgoj kvasca *S. cerevisiae* na hidrolizatu pšenične slame. Sastav hidrolizata je prikazan u Poglavlju 4.2. Za proizvodnju etanola na lignoceluloznim hidrolizatima dobivenim kiselinskom predobradom korištena su dva soja kvasca *S. cerevisiae*: (1) divlji soj i (2) soj Y9 kako je opisano u Poglavlju 3.2.3.1. Istraživanja su najprije provedena u manjem mjerilu odnosno u Erlenmeyer-ovoj tikvici kako bi se ispitala podobnost ovakvih hidrolizata za proizvodnju etanola pomoću ovih sojeva kvasac u većem mjerilu. Rezultati uzgoja prikazani su u Poglavljima 4.3.1. i 4.3.2.

#### 4.3.1. Anaerobni uzgoj divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* u Erlemeyer tikvici

U ovom poglavlju prikazani su rezultati anaerobnog uzgoja divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* na hidrolizatima dobivenim kiselinskom predobradom pšenične slame. Sastav hidrolizata korištenih za proces proizvodnje etanola pomoću ovog soja kvasca prikazan je u Tablici 7. Hidrolizati su pripremljeni za uzgoj na način opisan u Poglavlju 3.1.4.4., a proces alkoholnog vrenja praćen je na način opisan u Poglavlju 3.2.3.3. (Materijali i metode). Rezultati su prikazani grafički na Slikama 16., 17. i 18. Pokazatelji uspješnosti izračunati prema jednadžbama iz Poglavlja 3.2.7. prikazani su u Tablici 9.

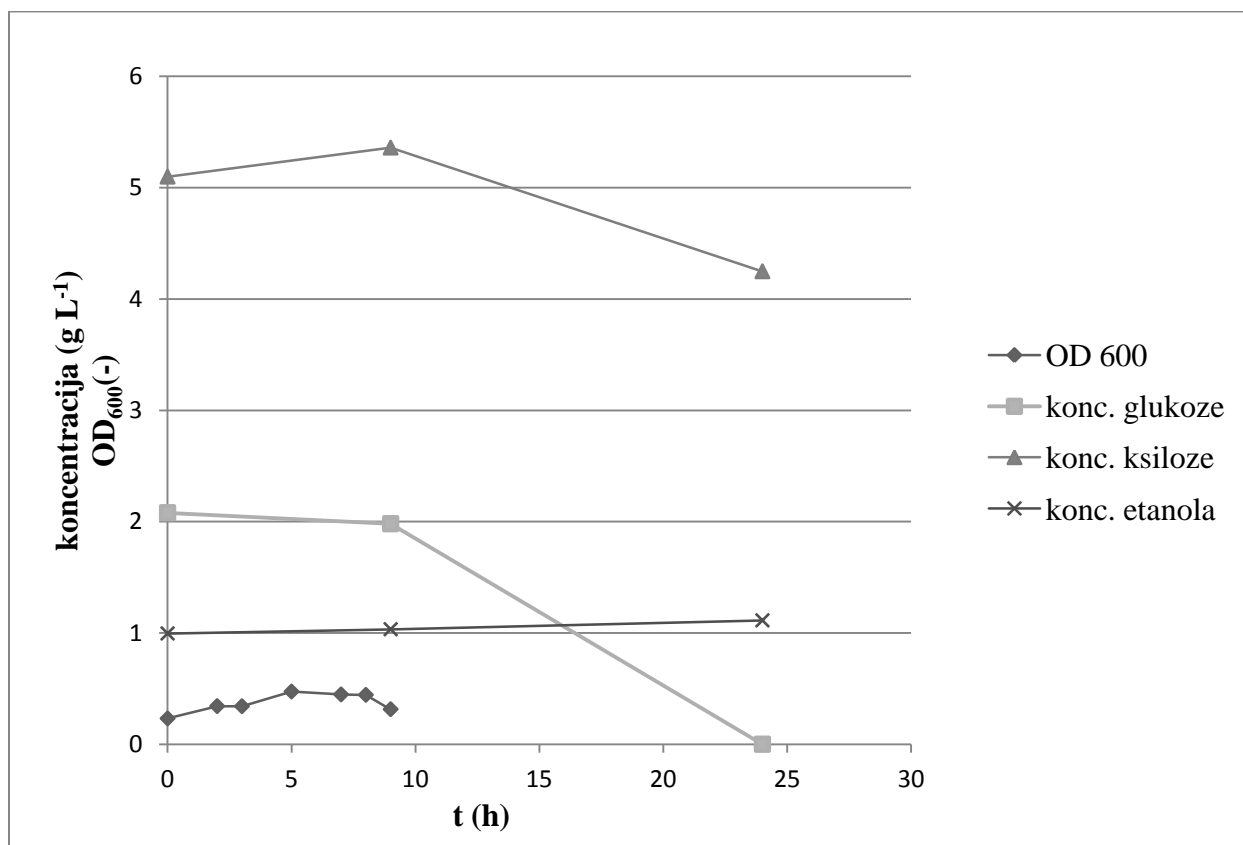
**Tablica 7.** Sastav hidrolizata korištenih za uzgoj divljeg soja kvasca *S. cerevisiae*

Uvjeti pri kojima su dobiveni hidrolizati	0,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /180 °C/1 min		0,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /200 °C/5 min	
	g L <sup>-1</sup>	g	g L <sup>-1</sup>	g
<b>Glukoza</b>	2,08	0,5198	5,69	1,4225
<b>Ksiloz</b>	5,10	1,2750	4,38	1,0950
<b>Arabinoza</b>	1,49	0,3725	0,76	0,1900
<b>Furani</b>	0,25	0,0625	0,80	0,2000

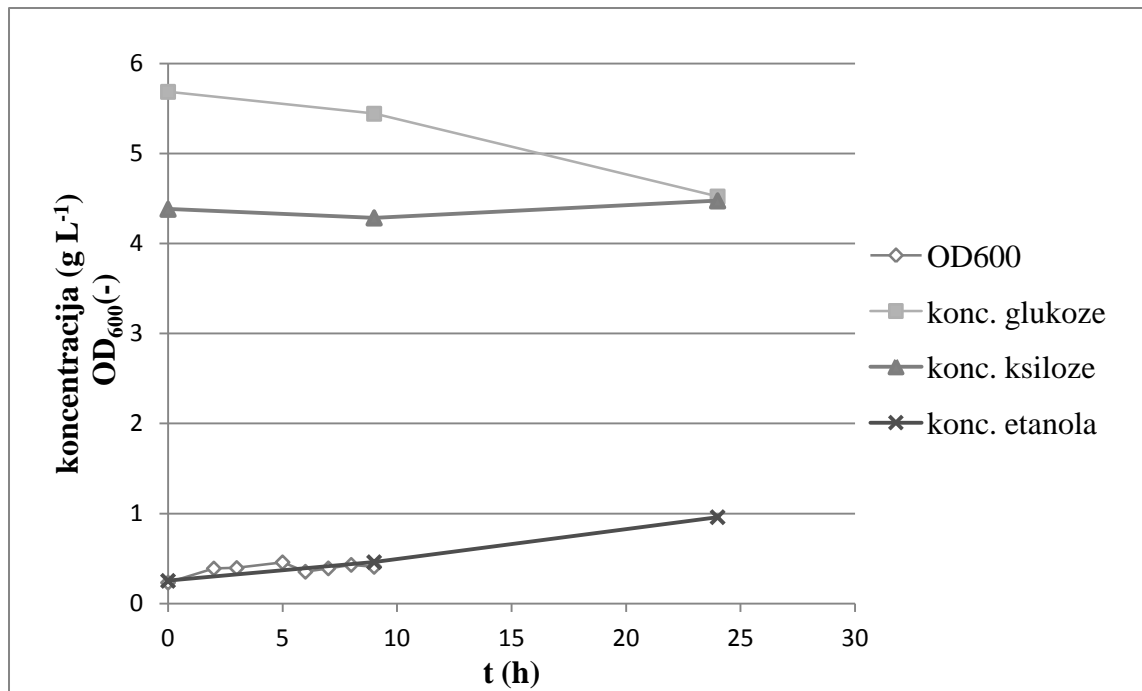
Za uzgoj divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* odabrani su hidrolizati dobiveni kiselinskom predobradom pšenične slame na 180 °C kroz 1 minutu i 200 °C kroz 5 minuta. Prethodno provedenim istraživanjem u sklopu već navedenog projekta dokazalo se da divlji soj kvasca *S. cerevisiae* ima sposobnost metaboliziranja glukoze i proizvodnje etanola u anaerobnim uvjetima (Mušak, 2016). Budući da divlji soj kvasca nema sposobnost metaboliziranja ksiloze i arabinoze odabrani su hidrolizati u kojima su dobivene veće koncentracije glukoze. Hidrolizat dobiven predobradom na 180 °C uz vrijeme zadržavanja od 1 minutu odabran je budući da je u tim uvjetima dobivena najveća koncentracija glukoze (3,52 g L<sup>-1</sup>) u odnosu na sve pretretmane provedene pri temperaturi od 160 °C (max. konc.= 2,24 g L<sup>-1</sup>), te su pri tom vremenu zadržavanja dobivene najmanje koncentracije inhibitora (u usporedbi sva tri vremena zadržavanja). Prilikom predobrade na temperaturi od 200 °C najveća koncentracija je dobivena uz vrijeme zadržavanja od 10 minuta, ali je ta koncentracija neznatno veća od one dobivene uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta, svega 0,11 g L<sup>-1</sup> odnosno 2,27 % viša (ako se max. konc. uzme kao referentna). Uzevši to u obzir odabran je hidrolizat dobiven

## Rezultati i rasprava

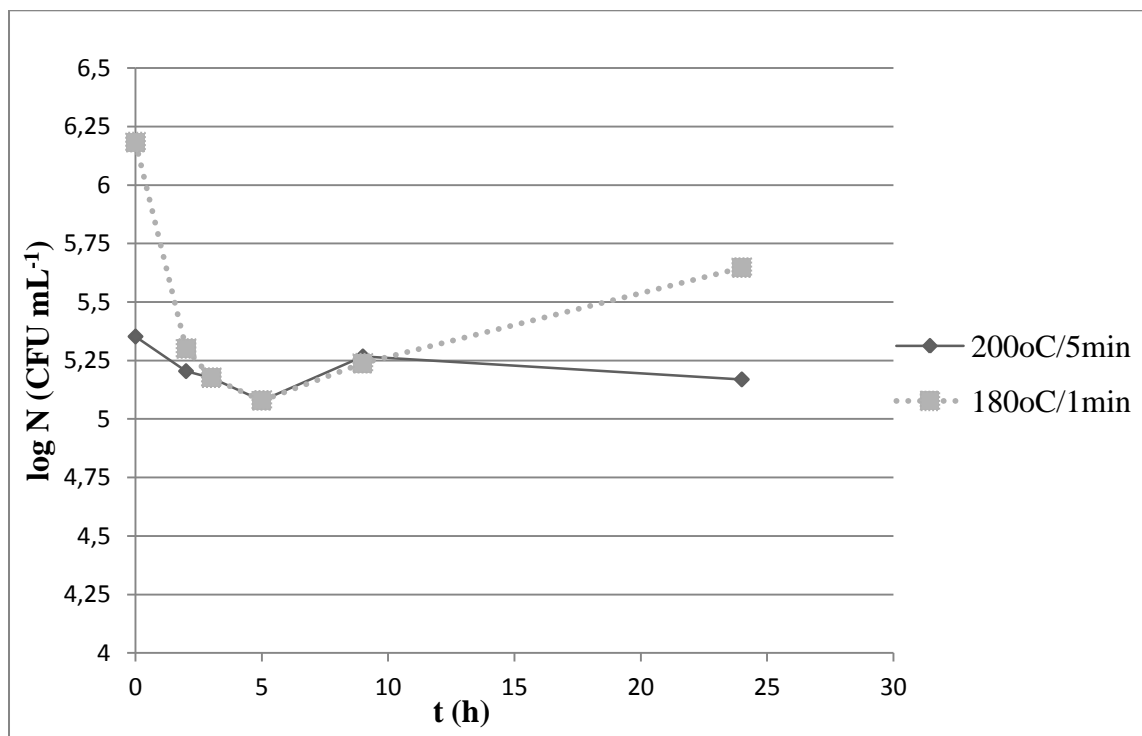
predobradom uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta budući da sadrži manje koncentracije mravlje i octene kiseline ( $0,96 \text{ g L}^{-1}$  mravlje i  $0,59 \text{ g L}^{-1}$  octene kiseline u odnosu na  $1,49 \text{ g L}^{-1}$  mravlje i  $1,02 \text{ g L}^{-1}$  octene kiseline). Hranjive podloge su pripravljene kako je opisano u poglavlju 3.1.4.4. Rezultati uzgoja su prikazani na Slikama 16.-18.



**Slika 16.** Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, etanola odnosno OD<sub>600</sub> tijekom anaerobnog uzgoja divljeg soja *S. cerevisiae* na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (predobrada na 180 °C i zadržavanju od 1 minute) tijekom uzgoja u Erlemeyer tikvici



**Slika 17.** Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, etanola odnosno OD<sub>600</sub> tijekom anaerobnog uzgoja divljeg soja *S. cerevisiae* na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (predobrada na 200 °C i zadržavanju od 5 minuta) tijekom uzgoja u Erlenmeyer tikvici



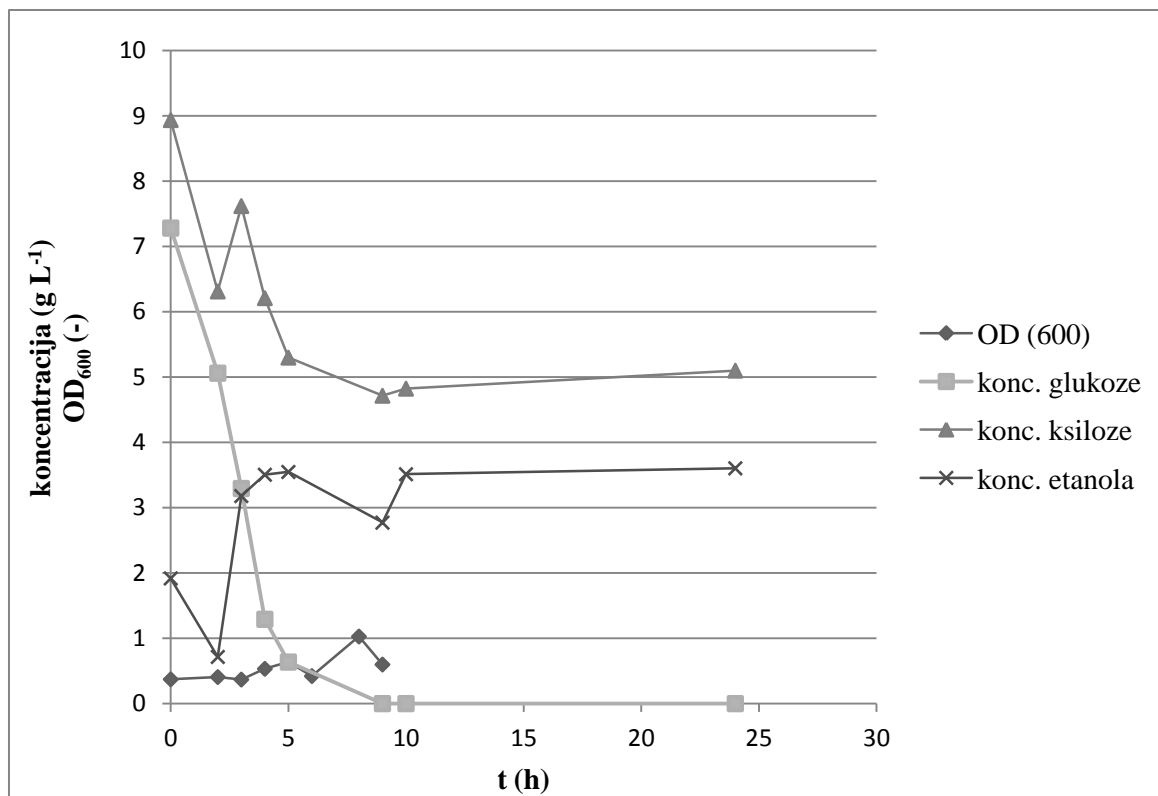
**Slika 18.** Promjena broja stanica kvasca (log N) tijekom anaerobnog uzgoja divljeg soja *S. cerevisiae* na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (predobrada na 180 °C i zadržavanju od 1 minuta i 200 °C i zadržavanje od 5 minuta) u Erlenmeyer tikvicama

Iz promjene koncentracije glukoze i ksiloze prikazane na Slici 16. tijekom uzgoja na hidrolizatu dobivenom predobradom pšenične slame na 180 °C kroz 1 minutu vidljivo je kako tijekom prvih 10 sati uzgoja nema značajnijih promjena koncentracije glukoze niti ksiloze. Izostanak rasta divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* tijekom tog razdoblja potvrđuju i vrijednosti apsorbancije na 600 nm koje se nisu značajnije mijenjale. Sukladno tome u prvih 10 sati uzgoja nije došlo ni do proizvodnje etanola što je vidljivo iz krivulje promjene koncentracije etanola na Slici 16. Početna koncentracija etanola određena u nultom satu može se objasniti dodatkom etanola prilikom inokulacije podloga budući da tijekom uzgoja inokuluma dolazi do sinteze etanola. Od 10. do 24. sata uzgoja došlo je do potpune potrošnje 2,0792 g L<sup>-1</sup> (0,5198 g) glukoze, pri čemu je također primjećen i blagi porast koncentracije etanola te je tijekom procesa ostvaren prinos etanola od 0,1174 g L<sup>-1</sup> (0,0295 g). Stupanj konverzije supstrata u proizvod, ( $Y_{p/s}$ ) odnosno etanol iznosi 0,05647 g g<sup>-1</sup>. Teorijski stupanj konverzije glukoze u etanol iznosi 0,51 g g<sup>-1</sup> (Kang i sur., 2014; Okamoto i sur., 2014), a budući da divlji soj kvasca *S. cerevisiae* nema sposobnost fermentiranja ksiloze, teoretska efikasnost procesa proizvodnje etanola na kiselinskom hidrolizatu pšenične slame (180 °C; 1 minute) iznosi 11,032 %. Pokazatelji uspješnosti procesa navedeni su u Tablici 9., a izračunati su prema jednadžbama navedenim u Poglavlju 3.2.7. (Materijali i metode). Promjena broja stanica kvasca tijekom uzgoja također je u skladu s rezultatima potrošnje glukoze i proizvodnje etanola. Iz krivulje je vidljiv pad broja stanica kvasca nakon inokulacije (s 6,18 CFU mL<sup>-1</sup> na 5,08 CFU mL<sup>-1</sup>), te blagi rast od 5. do 10. sata uzgoja gdje je zabilježena vrijednost od 5,24 CFU mL<sup>-1</sup>. Rast krivulje promjene broja stanica kvasca se nastavlja do 24. sata uzgoja te je u 24. satu zabilježena vrijednost od 5,65 CFU mL<sup>-1</sup>. Kod uzgoja divljeg soja *S. cerevisiae* na hidrolizatu pšenične slame dobivenog kiselinskom predobradom na 200 °C kroz 5 minuta zabilježen je sličan trend promjene broja stanica. Naime, broj stanica kvasca u prvih je 5 sati uzgoja ima tendenciju pada (s 5,35 CFU mL<sup>-1</sup> u nultom satu na 5,08 CFU mL<sup>-1</sup> u 5. satu), nakon čega je zabilježen blagi porast broja stanica (Slika 18.). Najveća koncentracija stanica je zabilježena u devetom satu uzgoja i iznosila je 5,27 CFU mL<sup>-1</sup>. Ovi rezultati upućuju kako je rast divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* na hidrolizatima pšenične slame predobrađene sumpornom kiselinom inhibiran. Kao što je već spomenuto tijekom predobrade lignocelulozne sirovine nastaju različiti inhibitori uslijed razgradnje šećera uzrokovane visokim temperaturama (Jönsson i Martin, 2015). Također rezultati prethodno provedenih istraživanja s divljim sojem kvasca pokazuju kako koncentracije furfurala veće od 0,5 g L<sup>-1</sup> značajno utječu na rast biomase kvasca (Mušak, 2016). Rezultati istog istraživanja također ukazuju na produženje lag faze rasta tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae* na hidrolizatima

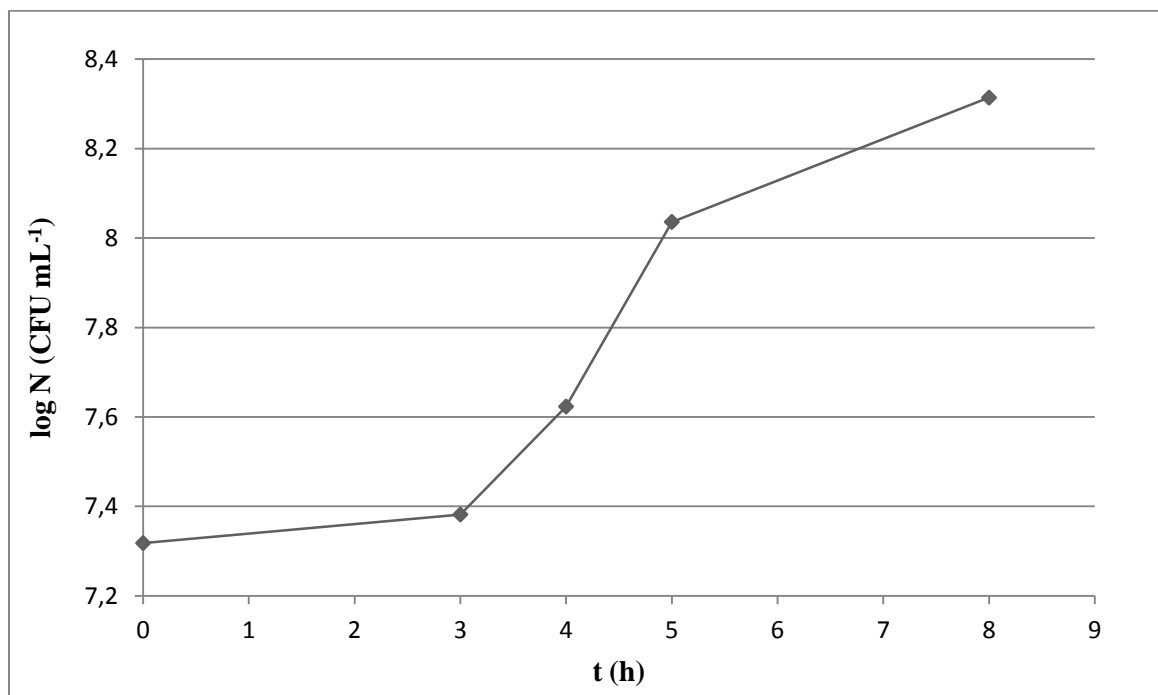
s prisutnošću furfurala (Mušak, 2016). Osim toga, furfural inhibitorno djeluje na aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze, aldehid dehidrogenaze i piruvat dehidrogenaze te na taj način utječe na sintezu etanola (Modig i sur., 2002). Smanjenje broja stanica kvasca *S. cerevisiae* tijekom prvih 5 sati uzgoja na oba hidrolizata može se objasniti produženom logaritamskom fazom rasta tijekom koje se mikroorganizam prilagođava na uvjete u hranjivoj podlozi iako je koncentracija furana (furfural i hidroksimetilfurfural) manja od  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ . Naime, furfural je samo jedan od inhibitora koji nastaju tijekom kiselinske predobrade pšenične slame. Uz furfural i hidroksimetilfurfural prisutne su i kiseline kao što su octena, mravlja i levulinska, te je zajedničko inhibitorno djelovanje svih prisutnih inhibitora uzrok usporenom rastu kvasca *S. cerevisiae*, malom prinosu etanola i posljedično tome maloj efikasnosti bioprocasa. U procesu proizvodnje etanola na hidrolizatu dobivenom predobradom na  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  i 5 minuta, kao što je vidljivo na Slici 17. glukoza nije u potpunosti utrošena. Utrošeno je  $1,1632 \text{ g L}^{-1}$  ( $0,2908 \text{ g}$ ) glukoze, a proizvedeno je  $0,6648 \text{ g L}^{-1}$  ( $0,1662 \text{ g}$ ) etanola. Stoga proizlazi kako stupanj konverzije ( $Y_{p/s}$ ) iznosi  $0,5715 \text{ g g}^{-1}$  što je  $12,06 \%$  veće od teoretskog stupnja konverzije glukoze u etanol koji kako je već navedeno, iznosi  $0,51 \text{ g g}^{-1}$ . Budući da je to nemoguće, može se zaključiti kako je došlo do pogreške tijekom uzorkovanja i analize uzorka. Ako bi zanemarili zadnju točku, odnosno rezultat dobiven u 24. satu uzgoja i izračunali koeficijente uspješnosti za prvih 9 sati uzgoja, stupanj konverzije iznosi  $0,1782 \text{ g g}^{-1}$ , a efikasnost procesa  $34,82 \%$ . Rezultati ovog dijela istraživanja upućuju da iako je prisutna inhibicija rasta i sinteze etanola, divlji soj *Saccharomyces cerevisiae* ima sposobnost proizvodnje etanola na hidrolizatima pšenične slame.

#### **4.3.2. Anarobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* soj Y9 u Erlenmeyer tikvici na kontrolnim podlogama**

U ovom poglavlju prikazani su rezultati anaerobnog uzgoja kvasca *S. cerevisiae* soj Y9 na kontrolnim podlogama koje su pripremljene na način opisan u Poglavlju 3.1.4.3. (Materijali i metode). Proces alkoholne fermentacije praćen je na način opisan u Poglavlju 3.2.3.3. Rezultati su prikazani grafički na Slikama 19.-22.



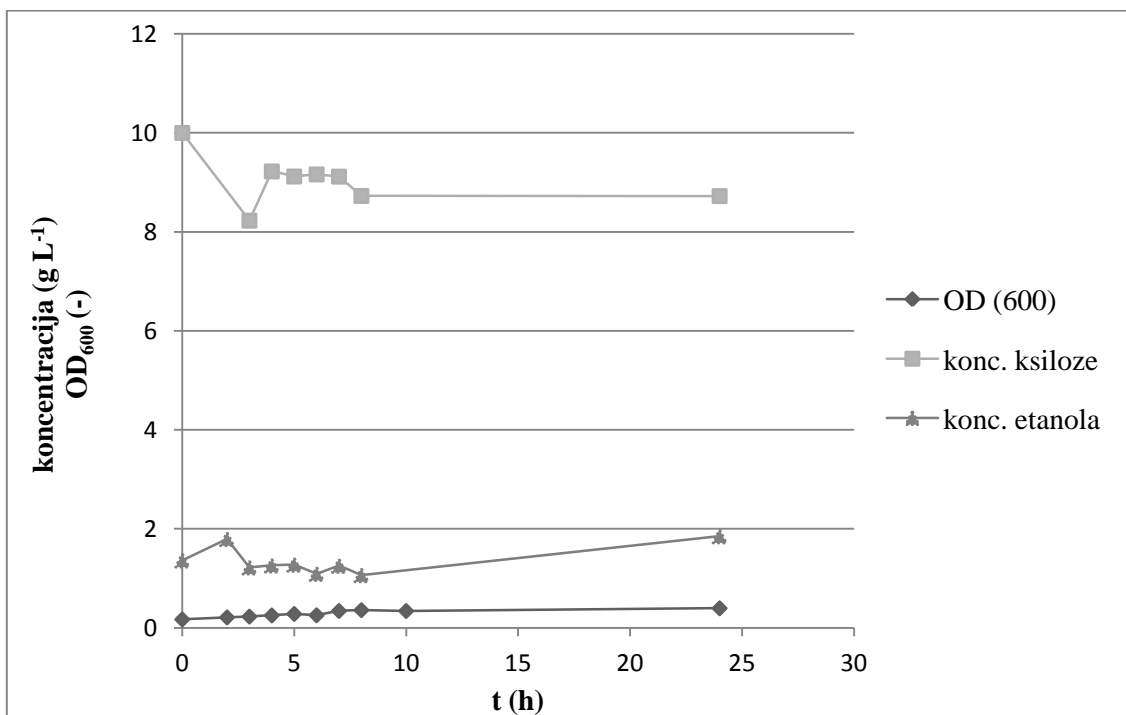
**Slika 19.** Promjena koncentracije glukoze, ksiloze etanola odnosno OD<sub>600</sub> tijekom anaerobnog uzgoja kvasca *S. cerevisiae*, soja Y9 na kontrolnoj hranjivoj podlozi s glukozom i ksilozom



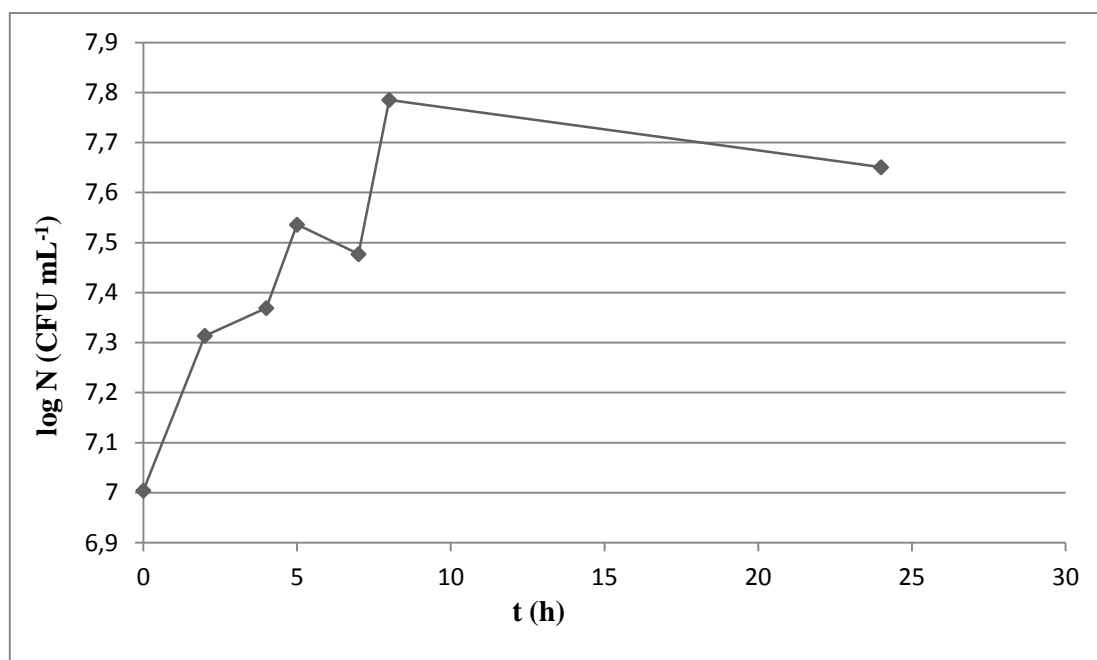
**Slika 20.** Promjena broja stanica kvasca (log N) tijekom anaerobnog uzgoja uzgoja kvasca *S. cerevisiae*, soja Y9 na kontrolnoj hranjivoj podlozi s glukozom i ksilozom



Kvasac *S. cerevisiae* soj Y9 je soj kvasca modificiran metodama genetičkog inženjerstva kako bi uz sposobnost metaboliziranja glukoze imao i sposobnost metaboliziranja ksiloze. Kako bi se to potvrdilo, proveden je uzgoj ovog soja kvasca na dvije kontrolne podloge. Uzgojem na prvoj kontrolnoj podlozi ispitivana je sposobnost kvasca da metabolizira ksilozu u prisustvu glukoze. U tu svrhu korištena je podloga koja je sadržavala i glukozu i ksilozu. Tijek anaerobnog uzgoja na ovoj kontrolnoj podlozi prikazan je na Slikama 19. i 20. iz kojih je vidljivo kako je tijekom uzgoja na ovoj kontrolnoj podlozi došlo je do potpune potrošnje glukoze nakon 6 sati uzgoja. Ukupno je utrošeno  $7,2824 \text{ g L}^{-1}$  glukoze (1,8206 g). Ksiloza nije u potpunosti potrošena te je utrošeno ukupno  $3,8372 \text{ g L}^{-1}$  (0,9593 g) ksiloze. Ukupno je utrošeno  $2,7799 \text{ g}$  supstrata (glukoze i ksiloze). Tijekom anaerobnog uzgoja došlo je do sinteze etanola te je prinos produkta iznosio  $1,686 \text{ g L}^{-1}$  (0,4215 g) (Tablica 9.) što je 20,38 % od maksimalne moguće količine etanola koja bi se proizvela uz potpunu potrošnju glukoze i ksiloze, a koja iznosi 2,0679 g. Iz proizvodnje etanola i utroška šećera proizlazi kako stupanj koverzije supstrata u etanol tijekom uzgoja na ovoj kontrolnoj podlozi iznosi  $0,1516 \text{ g g}^{-1}$ , a efikasnost 29,62 %. Promjena broja stanica kvasca tijekom uzgoja potvrđuje rast soja ovoga kvasca na kontrolnoj podlozi i u skladu je s dinamikom potrošnje šećera iz podloge (Slika 20.). Produktivnost procesa iznosi  $0,0703 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Pokazatelji uspješnosti procesa prikazani su u Tablici 9.



**Slika 21.** Promjena koncentracije ksiloze i etanola odnosno OD<sub>600</sub> tijekom anaerobnog uzgoja kvasca *S. cerevisiae*, soja Y9 na kontrolnoj hranjivoj podlozi s ksilozom



**Slika 22.** Promjena broja stanica kvasca (log N) tijekom anaerobnog uzgoja kvasca *S. cerevisiae*, soja Y9 na kontrolnoj hranjivoj podlozi s ksilozom

Kako bi se istražila mogućnost rasta ovog soja kvasca samo na ksilozi proveden je uzgoj na kontrolnoj podlozi koja je sadržavala samo ksilozu. Parametri praćeni tijekom uzgoja prikazani su na Slikama 21. i 22. Iz promjene koncentracije ksiloze vidljivo je kako ksiloza nije u potpunosti utrošena. Utrošak supstrata iznosio je  $1,2756 \text{ g L}^{-1}$  ( $0,3189 \text{ g}$ ) ksiloze ukupno, a proizvedeno je  $0,4876 \text{ g L}^{-1}$  ( $0,1219 \text{ g}$ ) etanola. Iz tih podataka proizlazi kako je stupanj konverzije ksiloze u etanol  $0,3822 \text{ g g}^{-1}$ , što je 74,95 % od maksimalnog teoretskog stupnja konverzije koji iznosi  $0,51 \text{ g g}^{-1}$ . Postignuta efikasnost (74,95 %) je veća od one postignute kod uzgoja na kontrolnoj podlozi s glukozom i ksilozom (29,62 %). Iz početnih 2,5 g ksiloze u kontrolnoj podlozi teoretski je moguće proizvesti 1,275 g etanola. Što znači da količina proizvedenog etanola iznosi svega 9,56 % od maksimalne mase etanola. Produktivnost procesa proizvodnje etanola na kontrolnoj podlozi s ksilozom iznosi  $0,0203 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  te je manja od produktivnosti postignute kod proizvodnje etanola na kontrolnoj podlozi koja je uz ksilozu sadržavala i glukozu ( $0,0703 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Iz promjene broja stanica kvasca vidljivo je kako je tijekom anaerobnog uzgoja došlo do rasta te je broj stanica s početnih  $7,0043 \text{ CFU mL}^{-1}$  porastao na  $7,6508 \text{ CFU mL}^{-1}$ . Pad broja stanica u 7 satu se može objasniti analitičkom pogreškom.

#### **4.3.3. Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* soj Y9 u Erlenmeyer tikvicama na hidrolizatima pšenične slame**

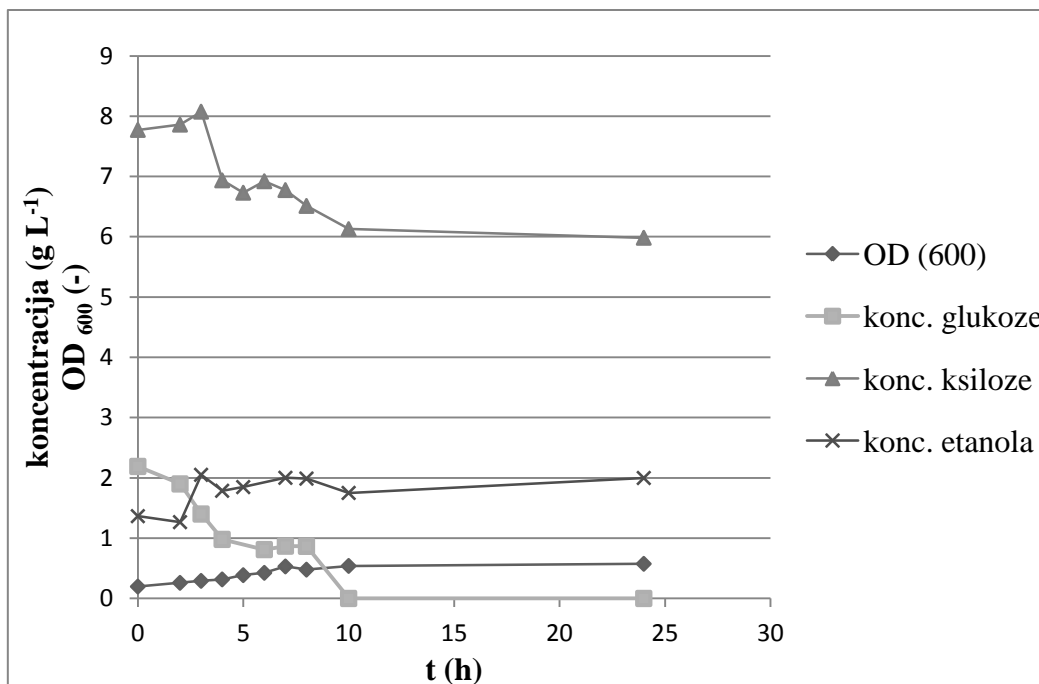
U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja kvasca *S. cerevisiae* soj Y9 na hidrolizatima dobivenim predobradom pšenične slame s 0,5 % sumpornom kiselinom. Hidrolizati su pripremljeni za uzgoj na način opisan u Poglavlju 3.1.4.4., a nadzor alkoholnog vrenja proveden je praćenjem parametara kako je opisano u Poglavlju 3.2.3.3. Rezultati su prikazani na Slikama 23.-28.. Pokazatelji uspješnosti procesa izračunati su prema jednadžbama navedenim u Poglavlju 3.2.7. i prikazani u Tablici 9.

Nakon potvrde sposobnosti soja kvasca Y9 da raste i proizvodi etanol metabolizirajući glukozu i ksilozu, proveden je njegov uzgoj na hidrolizatima pšenične slame dobivenim njenom kiselinskom predobradom. Budući da ovaj soj kvasca za razliku od divljeg soja, ima sposobnost trošenja ksiloze i glukoze, odabrani su hidrolizati koji sadrže što više koncentracije oba šećera. Za svaku temperaturu predobrade (160, 180 i 200 °C) odabrani su hidrolizati dobiveni uz najduže primijenjeno vrijeme zadržavanja, budući da su u tim uvjetima dobivene najviše koncentracije šećera ( $t_z=10$  min). Sastav hidrolizata korištenih u ovom dijelu istraživanja prikazan je u Tablici 8.

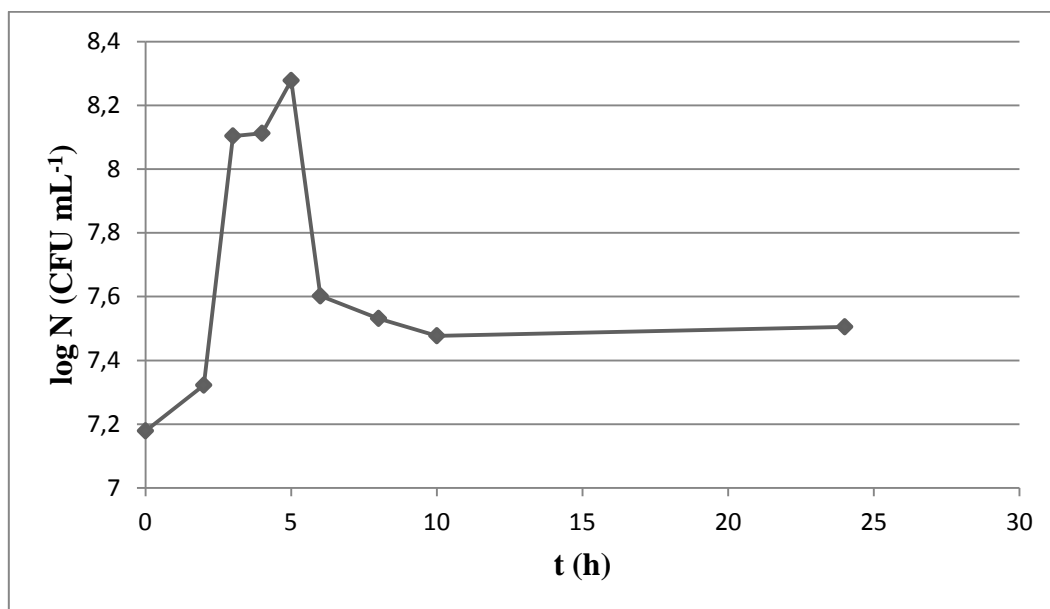
**Tablica 8.** Sastav hidrolizata korištenih za proizvodnju etanola

Uvjeti pri kojima su dobiveni hidrolizati	0,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / 160 °C/10 min		0,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / 180 °C/10 min		0,5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / 200 °C/10 min	
	g L <sup>-1</sup>	g	g L <sup>-1</sup>	g	g L <sup>-1</sup>	g
<b>Glukoza</b>	2,1904	0,5476	3,114	0,7785	2,5964	0,6491
<b>Ksiloza</b>	7,7724	1,9431	9,8732	2,4683	3,6888	0,9222
<b>Arabinoza</b>	1,56	0,39	1,72	0,43	1,14	0,285
<b>Furani</b>	0,3668	0,0917	0,5048	0,1262	0,8444	0,2111

4.3.3.1. Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* soj Y9 na hidrolizatu dobivenom kiselinom predobradom s 0,5% sumpornom kiselinom pri 160 °C kroz 10 minuta



Slika 23. Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, etanola odnosno OD600 tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae*, soj Y9 na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (predobrada na 160 °C i zadržavanju od 10 minuta) u Erlenmeyer tikvicama

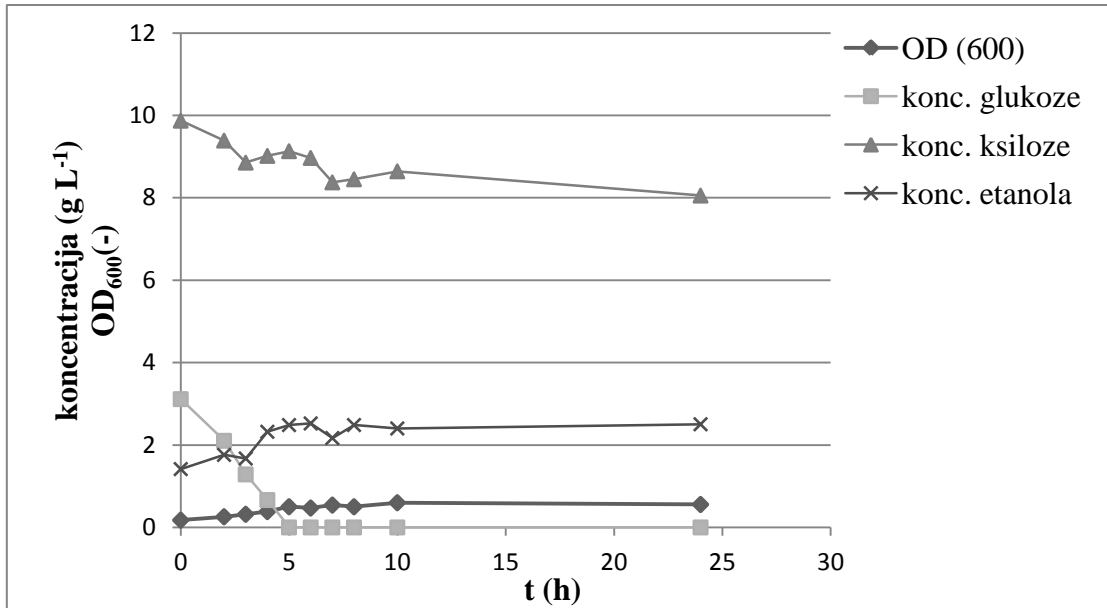


Slika 24. Promjena broja stanica kvasca (log N) tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae*, soj Y9 na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (predobrada na 160 °C kroz 10 minuta) u Erlenmeyer tikvici

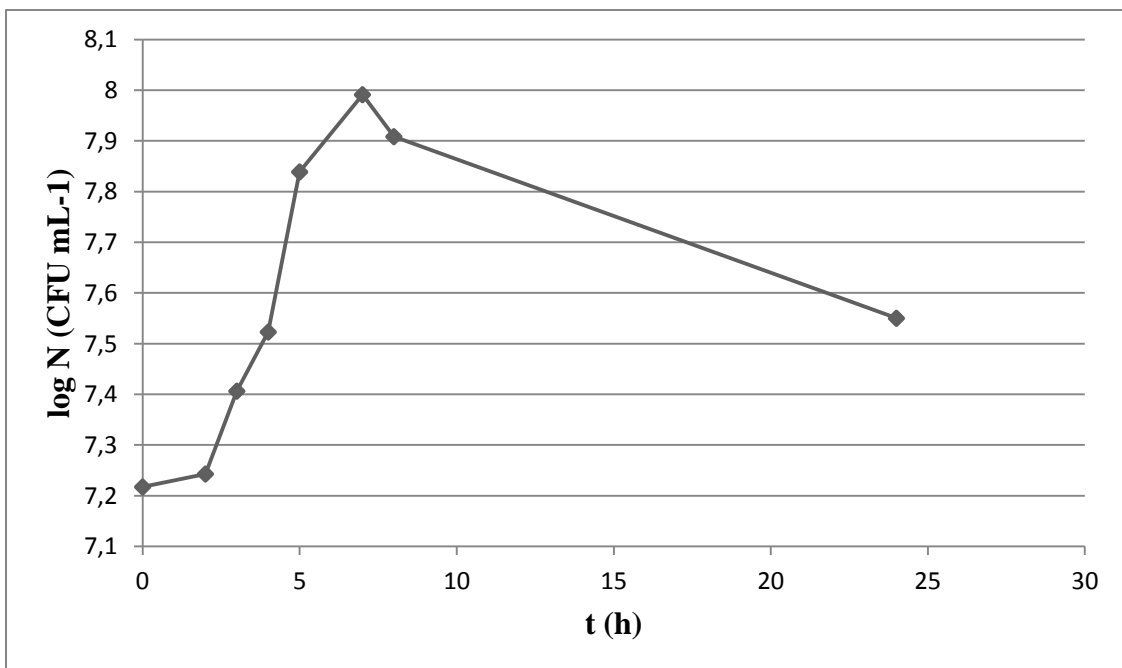
## Rezultati i rasprava

Iz promjene koncentracije glukoze prikazane na Slici 23. vidljivo je kako je do potpune potrošnje glukoze došlo u 10. satu uzgoja. Ksilozna nije u potpunosti potrošena no, njena se koncentracija od  $7,773 \text{ g L}^{-1}$  određene u nultom satu tijekom vremena smanjivala te je u 10. satu iznosila  $6,127 \text{ g L}^{-1}$ . Koncentracija ksiloze određena u 24. satu uzgoja nešto je veća od koncentracije za 10. sat, a moguće objašnjenje je smanjenje volumena hranjive podloge uslijed isparavanja (uzgoj je vođen na  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) te pogreške prilikom pripreme uzorka za analizu HPLC-om. Ukupno je utrošeno  $0,5476 \text{ g}$  glukoze i  $0,4473 \text{ g}$  ksiloze tijekom uzgoja, a ukupni utrošak supstrata iznosi  $0,9949 \text{ g}$ . Krivulja promjene koncentracije etanola pokazuje kako je tijekom uzgoja došlo do sinteze etanola. Tijekom bioprocesa sintetizirano je  $0,6332 \text{ g L}^{-1}$  ( $0,1583 \text{ g}$ ) etanola. Budući da bi se potpunim utroškom glukoze i ksiloze proizvelo  $1,2703 \text{ g}$  etanola, ostvareni prinos etanola čini  $12,46 \%$  maksimalne količine etanola. Stupanj konverzije supstrata u etanol iznosi  $0,1591 \text{ g g}^{-1}$  (Tablica 9.), a uz teoretski stupanj konverzije od  $0,51 \text{ g g}^{-1}$ , ostvarena efikasnost u procesu proizvodnje etanola na hidrolizatu dobivenom predobradom slame na  $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 10 minuta iznosi  $31,19\%$ . Tijekom procesa vrijednost apsorbancije na  $600 \text{ nm}$  se povećavala, a rast stanica kvasca potvrđuje i promjena broja stanica prikazana na Slici 24. Iz krivulje promjene broja stanica može se uočiti faza prilagodbe koja je trajala prva dva sata uzgoja nakon koje slijedi eksponencijalna faza rasta koja se nastavlja do 5 sata uzgoja. Ova pojava posljedica je potrošnje glukoze, a kada se ona u potpunosti utroši dolazi do značajnog usporavanja rasta kvasca, odnosno prilagodbe njegovog metabolizma za potrošnju ksiloze. Zbog prethodno navedenog dolazi do smanjenja broja stanica kvasca *S. cerevisiae* soj Y9 nakon 5. sata uzgoja (Slika 24.).

**4.3.3.2. Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* soj Y9 na hidrolizatu dobivenom kiselinom predobradom s 0,5% sumpornom kiselinom pri 180 °C kroz 10 minuta**



**Slika 25.** Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, etanola odnosno OD600 tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae*, soj Y9 na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (predobrada na 180 °C i zadržavanje od 10 minuta) u Erlenmeyer tikvici

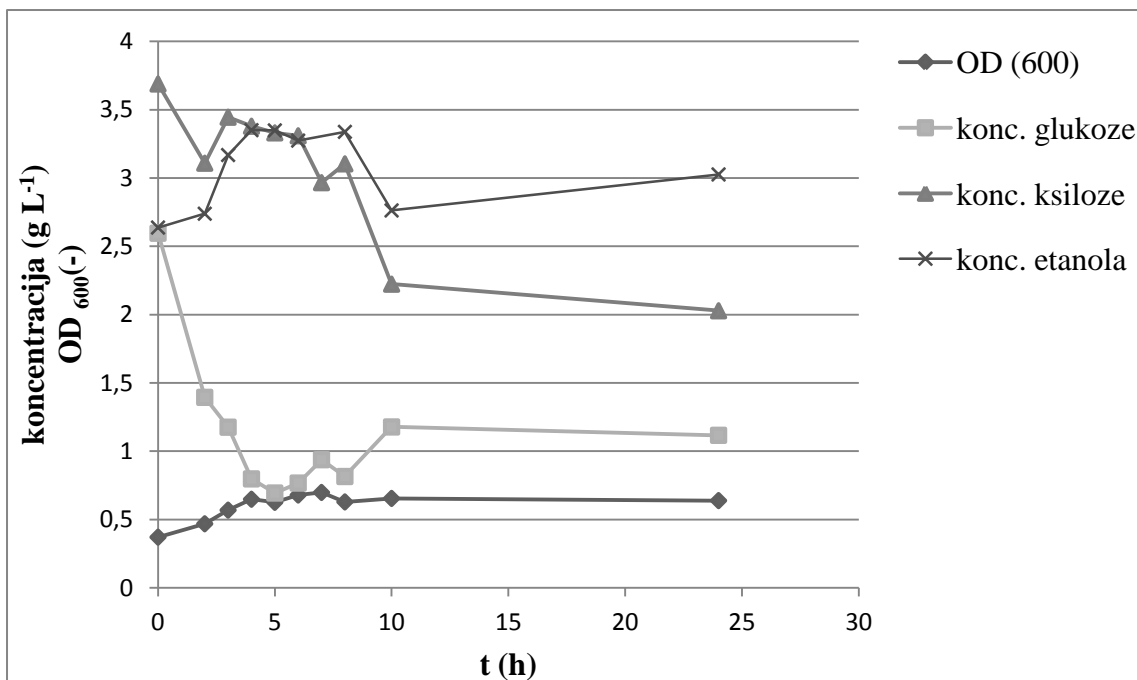


**Slika 26.** Promjena broja stanica kvasca (log N) tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae*, soj Y9 na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (predobrada na 180 °C kroz 10 minuta) u Erlenmeyer tikvici

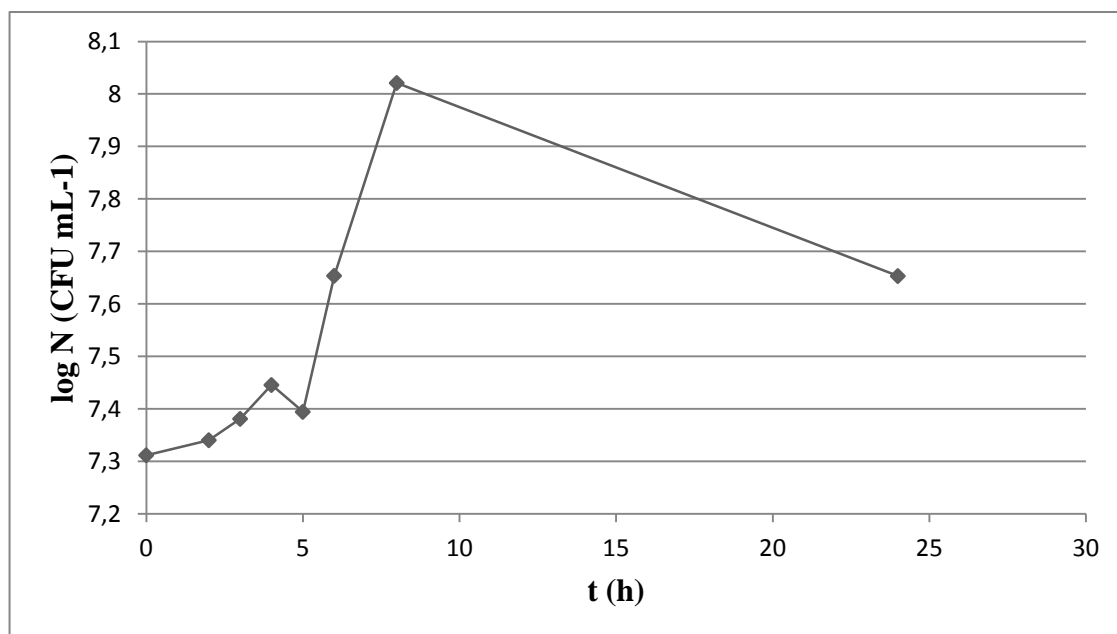
## Rezultati i rasprava

Tijekom uzgoja na hidrolizatu dobivenom predobradom pšenične slame s 0,5 % sumpornom kiselinom na 180 °C uz vrijeme zadržavanja od 10 minuta dobivena je najveća efikasnost procesa između sva tri uzgoja kvasca soja Y9 na lignoceluloznim hidrolizatima i ona iznosi 43,25 %. Do potpune potrošnje glukoze došlo je u 5. satu uzgoja, a tijekom uzgoja se koncentracija ksiloze smanjila s 9,873 g L<sup>-1</sup> na 8,056 g L<sup>-1</sup>. Ukupno je utošeno 4,9315 g L<sup>-1</sup> (1,2329 g) supstrata, od čega 3,1139 g L<sup>-1</sup> (0,7785 g) otpada na glukozu, a 1,8176 g L<sup>-1</sup> (0,4545 g) na ksilozu. Iz krivulje promjene koncentracije etanola vidljivo je da je tijekom uzgoja došlo do sinteze etanola te je postignut prinos produkta od 1,0876 g L<sup>-1</sup> (0,2719 g) etanola (Slika 25.). Postignuti prinos produkta iznosi 16,42 % od maksimalne količine produkta kojeg je moguće proizvesti iz šećera prisutnog u hidrolizatu. Stupanj koverzije supstrata u etanol za proces proizvodnje na ovom hidrolizatu iznosi 0,2206 g g<sup>-1</sup>, a to je 43,25 % od teorijskog stupnja konverzije (0,51 g g<sup>-1</sup>). Produktivnost procesa uzgoja i proizvodnje etanola na ovom hidrolizatu iznosi 0,045 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Tablica 9.). Tijekom uzgoja apsorbancija na 600 nm se također povećavala što upućuje na rast stanica kvasca. Na rast kvasca tijekom uzgoja na ovom hidrolizatu upućuje i promjena broja stanica koja je prikazana na Slici 26. Iz krivulje je vidljivo kako je rast broja stanica kvasca zabilježen sve do 8. sata uzgoja nakon čega slijedi blagi pad broja stanica kvasca u 10. satu uzgoja koji se nastavlja sve do kraja bioprocasa. Iz krivulje se također može primjetiti faza prilagodbe koja je trajala kroz prva dva sata uzgoja, na koju se do osmog sata uzgoja nastavlja eksponencijalna faza rasta. Od 8. do 24. sata uzgoja iz pada broja stanica kvasca može se zaključiti da je kvasac ušao u stacionarnu fazu.

**4.3.3.3. Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* soj Y9 na hidrolizatu dobivenom kiselinom predobradom s 0,5% sumpornom kiselinom pri 200 °C kroz 10 minuta**



**Slika 27.** Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, etanola, furfurala odnosno OD600 tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae*, soj Y9 na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (predobrada na 200 °C i zadržavanju od 10 minuta) u Erlenmeyer tikvici



**Slika 28.** Promjena broja stanica kvasca (log N) tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae*, soj Y9 na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (predobrada na 200 °C kroz 10 minuta) u Erlenmeyer tikvici



## Rezultati i rasprava

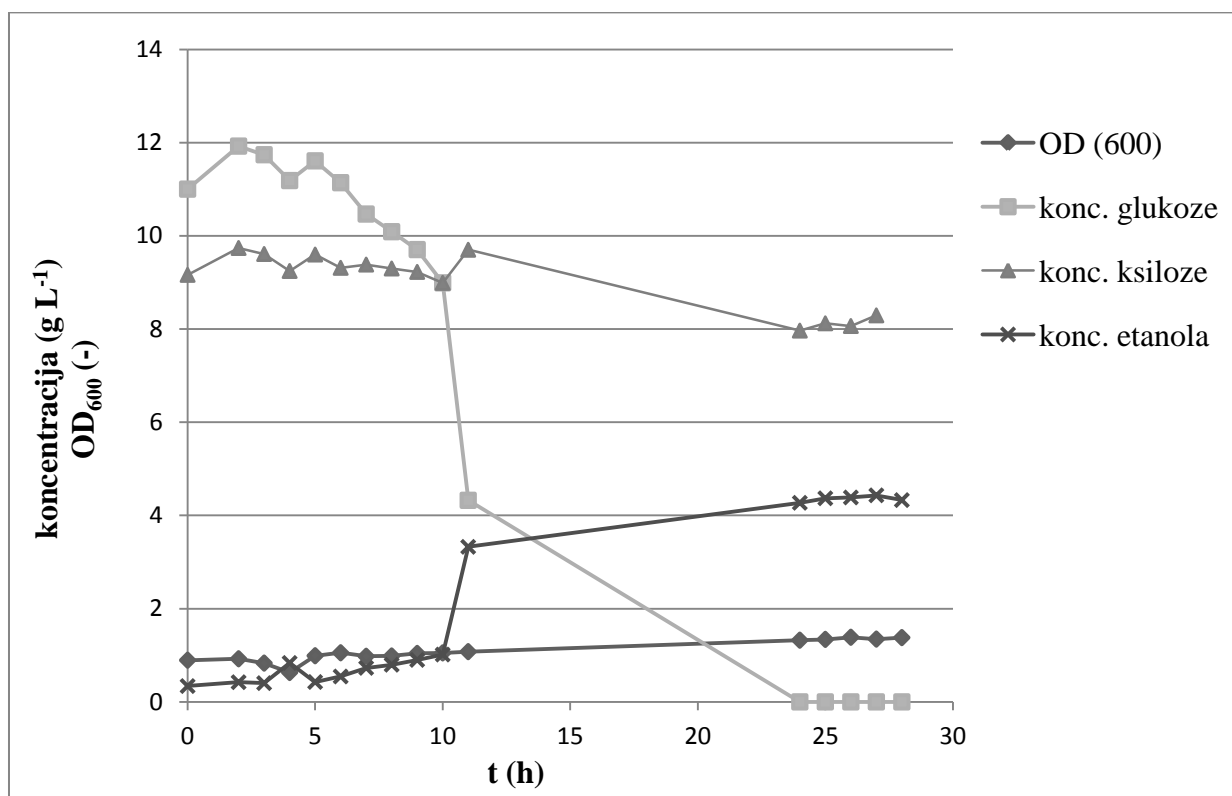
Treći uzgoj kvasca *S. cerevisiae* soja Y9 proveden je na hidrolizatu dobivenom predobradom pšenične slame na temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 10 minuta. Za razliku od prethodna dva uzgoja, glukoza nije u potpunosti potrošena (Slika 27.). Njena koncentracija na početku uzgoja iznosila je 2,596 g L<sup>-1</sup>, a nakon 24 sata uzgoja 1,117 g L<sup>-1</sup>. Ksilozu također nije u potpunosti utrošena, a njena koncentracija se tijekom 24 sata uzgoja smanjila s 3,689 g L<sup>-1</sup> na 2,029 g L<sup>-1</sup>. Ukupno je utrošeno 3,1397 g L<sup>-1</sup> (0,7849 g) supstrata, od toga 1,4796 g L<sup>-1</sup> (0,3699 g) glukoze i 1,6604 g L<sup>-1</sup> (0,4151 g) ksiloze. Iz krivulje promjene koncentracije etanola (Slika 27.) vidljivo je kako je i tijekom ovog uzgoja došlo do njegove sinteze te je prinos proizvoda iznosio 0,3887 g L<sup>-1</sup> (0,0972 g) što iznosi 12 % od maksimalne količine etanola koja može nastati potpunim utroškom glukoze i ksiloze (0,8013 g). Stupanj konverzije supstrata u etanol iznosi 0,1239 g g<sup>-1</sup>, što je 24,27 % od teoretskog stupnja konverzije (0,51 g g<sup>-1</sup>). Iz krivulje promjene broja stanica kvasca mogu se uočiti pojedine faze rasta (Slika 28.). Faza prilagodbe koja je trajala prva dva sata uzgoja, a nakon nje započinje eksponencijalna faza rasta koja je trajala do osmog sata uzgoja. Pad broja stanica kvasca u petom satu može se objasniti analitičkom pogreškom. Pad broja stanica kvasca od 8. do 24. sata upućuje na ulazak kulture u stacionarnu fazu rasta odnosno fazu odumiranja. Pokazatelji uspješnosti procesa navedeni su u Tablici 9. Produktivnost procesa uzgoja na ovom hidrolizatu iznosi 0,016 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Efikasnost procesa manja je od uzgoja na hidrolizatu dobivenom na 180 °C kroz 10 minuta i iznosi 24,27 %. Prema prikazanim podacima ovaj proces je bolji od onog provedenog na hidrolizatu dobivenom pri temperaturi od 160 °C. Iz pokazatelja uspješnosti procesa proizlazi kako je najuspješniji proces onaj proveden na hidrolizatu dobivenom predobradom pri uvjetima od 180 °C i vremenu zadržavanja od 10 minuta. Ako se uzgoj na tom hidrolizatu uspoređi s uzgojem istog soja kvasca na kontrolnoj podlozi koja je sadržavala glukozu i ksilozu, efikasnost je veća za proces uzgoja na hidrolizatu (43,25 % prema 29,62%). No produktivnost je veća kod uzgoja na kontrolnoj podlozi gdje iznosi 0,070 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, dok na hidrolizatu dobivenom na 180 °C ista iznosi 0,045 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Ova pojava može se objasniti činjenicom da kontrolna podloga u odnosu na podlogu s hidrolizatom pšenične slame ne sadrži inhibitore rasta kvasca koji imaju značajan utjecaj na dinamiku odvijanja bioprocasa odnosno na njegovu produktivnost. Budući da pokazatelji uspješnosti (Tablica 9.) upućuju kako je najuspješniji uzgoj bio na hidrolizatu dobivenom predobradom pšenične slame na 180 °C kroz 10 minuta, taj hidrolizat iskorišten je za uzgoj u većem mjerilu, odnosno u horizontalnom rotirajućem cijevnom reaktoru (HRCB-u).

**Tablica 9.** Pokazatelji uspješnosti procesa anarobnog uzgoja divljeg soja i soja Y9 kvasca *S. cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama

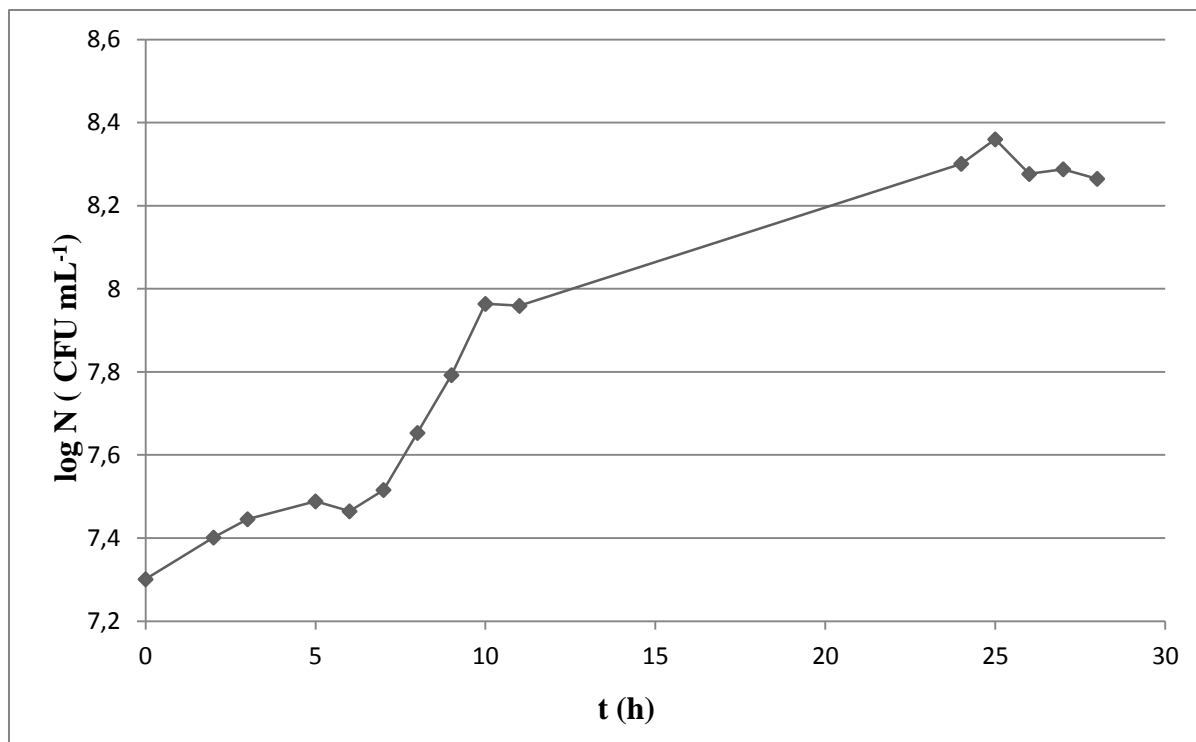
<b>Podloga i soj kvasca</b>	<b>Potrošnja supstrata (g)</b>	<b>Prinos produkta (g)</b>	<b>Y p/s (g g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pr (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	<b>E (%)</b>
<b>divlji soj/hidrolizat: 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/180 °C/1 min</b>	0,5198	0,0295	0,05647	0,0049	11,032
<b>divlji soj/hidrolizat: 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/200 °C/5 min</b>	0,2908	0,1662	0,1782	0,0277	34,82
<b>soj Y9/kontrolna podloga s glukozom i ksilozom</b>	2,7799	0,4215	0,1516	0,0703	29,62
<b>soj Y9/kontrolna podloga s ksilozom</b>	0,3189	0,1219	0,3822	0,0203	74,95
<b>soj Y9/ hidrolizat: 0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/160 °C/10 min</b>	0,9949	0,1583	0,1591	0,0633	31,19
<b>soj Y9/ hidrolizat: 0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/180 °C/10 min</b>	1,2329	0,2719	0,2206	0,0453	43,25
<b>soj Y9/ hidrolizat: 0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/200 °C/10 min</b>	0,785	0,0973	0,123	0,0162	24,27

#### 4.4. Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* soj Y9 na hidrolizatu pšenične slame u horizontalnom rotirajućem cijevnom reaktoru

U ovom poglavlju prikazani su rezultati anaerobnog uzgoja soja Y9 kvasca *S. cerevisiae* i proizvodnje etanola na hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom pšenične slame u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru prikazanom u Poglavlju 3.1.5.4. (Materijali i metode). Hidrolizat je pripremljen za uzgoj na način opisan u Poglavlju 3.1.4.5. Nadzor alkoholnog vrenja vođen je na način opisan u Poglavlju 3.2.3.3., a rezultati su prikazani na Slikama 29. i 30. Pokazatelji uspješnosti procesa prikazani u Tablici 10. izračunati su prema jednadžbama navedenim u Poglavlju 3.2.7.



**Slika 29.** Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, etanola odnosno OD600 tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae*, soj Y9 na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (predobrada na 180 °C i 10 minuta) u HRCB-u



**Slika 30.** Promjena broja stanica kvasca ( $\log N$ ) tijekom anaerobnog uzgoja *S. cerevisiae*, soj Y9 na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame (predobrada na 180 °C kroz 10 minuta) u HRCB-u

Kako bi se ispitala mogućnost provođenja procesa proizvodnje etanola na hidrolizatu pšenične slame u poluindustrijskom mjerilu proveden je uzgoj kvasca *S. cerevisiae* u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB). Taj bioreaktor konstruiran je za uzgoj na polučvrstim (i/ili čvrstim) supstratima, baš kakve su i hranjive podloge koje sadržavaju hidrolizate lignoceluloznih sirovina. HRCB se tijekom uzgoja intervalno rotirao (12 minuta rotacija od 10 min<sup>-1</sup> i 48 minuta mirovanje), a korisni volumen bioreaktora je iznosio 5 L. Ovi uvjeti uzgoja su odabrani u skladu s rezultatima prethodno provedenih istraživanja (Pavlečić, 2013). Kao hranjiva podloga korišten je hidrolizat dobiven predobradom na 180 °C i vremenom zadržavanja od 10 minuta u skladu s rezultatima istraživanja provedenih u Erlenmeyer tikvicama. Kako bi se ostvario veći prinos proizvoda i veća produktivnost procesa u hidrolizat je na početku uzgoja dodano i 10 g L<sup>-1</sup> (50 g) glukoze čime je koncentracija glukoze u hranjivoj podlozi povećana na 11,0021 g L<sup>-1</sup>. Kod uzgoja u tikvicama koncentracija glukoze u hidrolizatu dobivenom predobradom na 180 °C kroz 10 min je iznosila 3,1139 g L<sup>-1</sup>.

Tijekom uzgoja u HRCB-u potrošena je sva glukoza (55,0105 g), što je detektirano nakon 24 sata uzgoja (Slika 29.). Ksilozu nije u potpunosti potrošena, te je od početnih 9,1626 g L<sup>-1</sup> (ukupno 45,813 g) ksiloze na kraju preostalo 7,942 g L<sup>-1</sup> (39,71 g), odnosno utrošeno je 13,32 % ksiloze. Ukupno je utrošeno 61,1135 g supstrata. Iz krivulje promjene koncentracije etanola vidljivo je da je došlo do njegove sinteze. Prinos produkta tijekom uzgoja iznosi 3,9903 g L<sup>-1</sup> (19,9515 g) etanola. Stupanj konverzije supstrata u etanol iznosi 0,327 g g<sup>-1</sup>, što je 64,02 % od teorijskog stupnja konverzije, te efikasnost procesa iznosi 64,01 % (Tablica 10.). Efikasnost govori o odnosu količine proizvedenog etanola i maksimalne količine etanola koju je iz iste količine supstrata moguće proizvesti. Uz potpunu potrošnju glukoze i ksiloze (ukupno 100,8235 g) nastalo bi 51,4199 g etanola, što znači da je ostvareni prinos etanola 38,80 %. Rast kvasca *S. cerevisiae* pratio se mjerenjem promjene adsorbancije na 600 nm i određivanjem broja stanica kako je opisano u Poglavlju 3.2.4.6. i 3.2.4.7. Promjena broja stanica kvasca tijekom uzgoja, uz povećanje apsorbancije na 600 nm ukazuje na rast i aktivnost kvasca (Slike 29. i 30.). Iz krivulje se može primjetiti nešto dulja log faza koja je trajala prvih 5 sati uzgoja. Nešto duža faza prilagodbe može se objasniti prisustvom inhibitora u hidrolizatu kao što su furfural i hidroksimetilfurfural. Naime, u literaturi se navodi kako furfural uzrokuje produljenje logaritamske faze rasta tijekom koje dolazi do njegovog metaboliziranja, nakon čega započinje eksponencijalna faza rasta (Helle i sur., 2003). Furfural se metabolizira u furfuralni alkohol, a HMF se reducira u 5-hidroksimetil furfuralni alkohol koji su manje inhibitorni za stanice kvasca (Helle i sur., 2003; van der Pol i sur., 2014). Stoga je smanjenje koncentracije furfurala s početnih 0,157 g L<sup>-1</sup> na 0,0152 g L<sup>-1</sup> određenih u 28. satu uzgoja također u skladu s literaturom. Između 24. sata i 48. sata uzgoja nije bilo značajnije promjene broja stanica kvasca što upućuje da je započela stacionarna faza rasta. Pokazatelji uspješnosti procesa anaerobnog uzgoja kvasca *S. cerevisiae* i proizvodnje etanola na odabranom hidrolizatu u HRCB-u prikazani su u Tablici 10. Produktivnost procesa proizvodnje etanola na hidrolizatu pšenične slame pomoću soja Y9 kvasca *S. cerevisiae* u HRCB-u iznosi 0,143 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Ta vrijednost je veća od one dobivene prilikom uzgoja i proizvodnje etanola na istom hidrolizatu u tikvici gdje je iznosila 0,045 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Osim toga, efikasnost procesa u HRCB-u veća je nego kod uzgoja u tikvici i iznosi 64,01 %. Dobivene vrijednosti za pokazatelje uspješnosti procesa ujedno su i veće od vrijednosti dobivenih uzgojem divljeg soja kvasca na hidrolizatu pšenične slame u HRCB-u koji je prethodno proveden u sklopu ovoga projekta. Ostvarena produktivnost tijekom uzgoja divljeg soja „Županja“ kvasca *S. cerevisiae* na hidrolizatu pšenične slame u HRCB-u iznosila je 0,0678 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, a efikasnost 42 % (Mušak, 2016). Potrebno je i naglasiti da je sastav hidrolizata u tom

## Rezultati i rasprava

istraživanju bio nešto drugačiji te je sadržavao 7,19 g L<sup>-1</sup> glukoze i 2,54 g L<sup>-1</sup> ksiloze (Mušak, 2016). Veće vrijednosti pokazatelja uspješnosti procesa proizvodnje etanola u HRCB-u su posljedica dodatka glukoze na početku procesa da bi se dobila veća koncentracija etanola odnosno veća produktivost i efikasnost bioprocesa. Međutim, potrebno je istaknuti kako je neophodno daljnje optimiranje postupaka predobrade lignoceluloznih sirovina kako bi se uspješnost bioprocesa dodatno povećala, te kako bi se postigle veće koncentracije šećera u lignoceluloznim hidrolizatima čime bi se izbjegao dodatak glukoze u hranjivu podlogu čija primjena povećava troškove proizvodnje bioetanola..

**Tablica 10.** Pokazatelji uspješnosti za proces anarebnog uzgoja kvasca *S. cerevisiae* i proizvodnje etanola na hidrolizatu pšenične slame u HRCB-u

<b>Podloga i soj kvasca</b>	<b>Potrošnja substrata (g)</b>	<b>Prinos produkta (g)</b>	<b>Y p/s (g g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pr (g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	<b>E (%)</b>
<b>soj Y9/hidrolizat: 0,5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/180 °C/10 min</b>	61,1135	19,9515	0,327	0,143	64,01



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata opisanih u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Pšenična slama sastoji se od 51,93 % glukana, 21,06 % ksilana, 5,12 % arabinana, 3,04 % octene kiseline, 2,21 % mravlje kiseline, 15,88 % lignina netopivog u kiselini i pepela, te 0,24 % lignina topivog u kiselini.
2. Nakon kiselinske predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru, pri temperaturama od 150 °C, 160 °C, 170 °C, 180 °C, 190 °C i 200 °C, vremenu zadržavanja ( $t_z$ ) od 5 minuta i koncentracije sumporne kiseline od 0,5%, dobivene su dvije faze: čvrsta (predobrađena pšenična slama) i tekuća faza. Najveća koncentracija glukoze u tekućoj fazi od 4,7257 g L<sup>-1</sup> zabilježena je na temperaturi od 200 °C, a najveća koncentracija ksiloze od 13,0154 g L<sup>-1</sup> i arabinoze od 1,6827 g L<sup>-1</sup> zabilježena je na temperaturi predobrade od 160 °C. Koncentracija octene kiseline kretala se u rasponu od 0,3368 g L<sup>-1</sup> do 1,0274 g L<sup>-1</sup>, a koncentracija mravlje kiseline u rasponu od 0,2429 g L<sup>-1</sup> do 1,2208 g L<sup>-1</sup>. Na temperaturama od 190 °C i 200 °C zabilježena je pojava levulinske kiseline u koncentraciji od 0,0550 i 0,0580 g L<sup>-1</sup>. Najveći udio lignina topivog u kiselini zabilježen je na temperaturi predobrade od 200 °C i iznosio je 1,6447 %.
3. Nakon kiselinske predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru, pri temperaturi od 160 °C, vremenu zadržavanja ( $t_z$ ) od 1,5 i 10 minuta i koncentracije sumporne kiseline od 0,5 % dobivene su dvije faze: čvrsta (predobrađena pšenična slama) i tekuća faza. Najveći maseni udio glukana u tekućoj fazi od 15,67 % postignut je pri  $t_z = 10$  minuta, ksilana od 68,64 % pri  $t_z = 5$  minuta, a najveći maseni udio arabinana od 12,21 % pri  $t_z = 1$  minuta. Najveći maseni udio furana dobiven je pri  $t_z = 5$  minuta i iznosi 1,67 %, a najveći maseni udio mravlje kiseline od 6,48 % pri  $t_z = 1$  minuta i octene kiseline od 5,74 % uz  $t_z = 5$  minuta.
4. Nakon kiselinske predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru, pri temperaturi od 180 °C, vremenu zadržavanja ( $t_z$ ) od 1,5 i 10 minuta i koncentracije sumporne kiseline od 0,5 % dobivene su dvije faze: čvrsta (predobrađena pšenična slama) i tekuća faza. Najveći maseni udio glukana u tekućoj fazi od 20,96 % postignut je pri  $t_z = 1$  minuta, ksilana od 53,82 % pri  $t_z = 5$  minuta, a najveći maseni udio arabinana od 8,98 % pri  $t_z = 10$  minuta. Najveći maseni udio furana dobiven je pri  $t_z = 5$



- minuta i iznosi 6,12 %, a najveći maseni udio mravlje kiseline od 6,82 % pri  $t_z=5$  minuta i octene kiseline od 6,24 % uz  $t_z=10$  minuta.
5. Nakon kiselinske predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru, pri temperaturi od 200 °C, vremenu zadržavanja ( $t_z$ ) od 1, 5 i 10 minuta i koncentracije sumporne kiseline od 0,5 % dobivene su dvije faze: čvrsta (predobrađena pšenična slama) i tekuća faza. Najveći maseni udio glukana u tekućoj fazi od 30,42 % postignut je pri  $t_z=10$  minuta, ksilana od 42,29 % pri  $t_z=1$  minuta, a najveći maseni udio arabinana od 8,72 % pri  $t_z=1$  minuta. Najveći maseni udio furana dobiven je pri  $t_z=10$  minuta i iznosi 6,49 %, a najveći maseni udio mravlje kiseline od 10,37 % pri  $t_z=10$  minuta i octene kiseline od 7,14 % uz  $t_z=10$  minuta.
  6. Anaerobni uzgoj divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama na hidrolizatima dobivenim kiselinskom predobradom pšenične slame pokazuje sposobnost kvasca da raste i sintetizira etanol na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina. Najuspješniji bioproces u kojem je ostvarena efikasnost od 34,82 % i produktivnost od 0,0277 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> zabilježen je kod uzgoja na hidrolizatu dobivenom predobradom na temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 minuta.
  7. Anaerobni uzgoj soja Y9 kvasca *S. cerevisiae* na kontrolnoj podlozi s glukozom i ksilozom pokazuje sposobnost kvasca da metabolizira ksilozu u prisutnosti glukoze, a anaerobni uzgoj soja Y9 na kontrolnoj podlozi koja je sadržavala samo ksilozu pokazuje sposobnost kvasca da proizvodi etanol i raste samo na ksilozi.
  8. Anaerobni uzgoj soja Y9 kvasca *S. cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama na hidrolizatima dobivenim kiselinskom predobradom pšenične slame pokazuje sposobnost kvasca da raste i sintetizira etanol na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina. Prema pokazateljima uspješnosti procesa, najuspješniji je bio proces proizvodnje etanola na hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom pšenične slame na 180 °C i vremenu zadržavanja od 10 minuta gdje je ostvarena efikasnost od 43,25 %, produktivnost od 0,0453 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> i stupanj konverzije supstrata u etanol od 0,2206 g g<sup>-1</sup>.
  9. Anaerobni uzgoj soja Y9 kvasca *S. cerevisiae* u HRCB-u na hidrolizatu dobivenom kiselinskom predobradom pšenične slame na 180 °C uz vrijeme zadržavanja od 10 minuta pokazuje na mogućnost korištenja soja Y9 za proizvodnju etanola na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina. Ostvarena je produktivnost od 0,143 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, efikasnost od 64,01 % i stupanj konverzije supstrata u etanol od 0,327 g g<sup>-1</sup>.

Zaključci

**LITERATURA**

## 6. LITERATURA

Bajpai, P. (2016) Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels Production, Springer, Singapur.

Barrett D. M., Delwiche M. J., Kumar P., Stroeve P. (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production, Industrial & Engineering Chemistry Research 48:8, ACS Publications, SAD, str. 3713 - 3729.

Bischof, R. H., Ramoni, J., Seiboth, B. (2016) Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb. Cell. Fact.* **15**:106.

Blaschek H. P., Ezeji T., Scheffran J. (2010) Biofuels from Agricultural Wastes and Byproducts: An Introduction, Blackwell Publishing, SAD.

Boe A., Jeranyama P., Lee D. K., Owens V. N. (2007) Composition of Herbaceous Biomass Feedstocks, South Dakota State University, SAD, str. 7-10.

Cao, W., Sun, C., Liu, R., Yin, R., Wu, X. (2012) Comparison of effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. *Bioresource Technol.* **111**, 215-221.

Carrere H., Rouches E., Steyer J. P., Zhou S. (2015) White-Rot Fungi Pretreatment of Lignocellulosic Biomass of Anaerobic Digestion: Impact of Glucose Supplementation, *Process Biochemistry*, Elsevier, SAD.

Chandel, A. K., Felipe, A.F., Vaz de Arruda, P.A., Milessi, T.S.S., da Silvia, S.S., Gracas, M. (2012) Dilute Acid Hydrolysis of Agro-Residues for the Depolymerization of Hemicellulose: State of the Art. U: D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization, (da Silva, S.S., Chandel, A.K., ured.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str. 39-61.

Chandel, A. K., Felipe, A.F., Vaz de Arruda, P.A., Milessi, T.S.S., da Silvia, S.S., Gracas, M. (2012) Dilute Acid Hydrolysis of Agro-Residues for the Depolymerization of Hemicellulose: State of the Art. U: D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization, (da Silva, S.S., Chandel, A.K., ured.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str. 39-61.

Chen, H., Qiu, W. (2010) Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnol. Adv.* **28**, 556-562.

## Literatura

- Chen, Y., Stevens, M. A., Zhu, Y., Holmes, J., Xu, H. (2013) Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnol. Biofuels.* **6**,8.
- Demirbas, A. (2005) Biomass Feedstocks. *Biotechnology.* **7**, 1-10.
- Demirbas, A. (2009) Biomass Feedstocks U: Biofuels. Springer, Berlin.
- Djiroleu, A., Carrier, D. J. (2016) Effects of Dilute Acid Pretreatment Parameters on Sugar Production during Biochemical Conversion of Switchgrass Using a Full Factorial Design. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **4(8)**, 4124-4130.
- Dragone, G., Fernandes, B. D., Teixeira, A.J. (2010) Third generation biofuels from microalgae. U: Current research, technology, and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, 2 izd. (Mendez-Vilas, A., ured.), Formatex Research Center, Badajoz, str. 1355-1366.
- Dutta, S., De, S., Saha, B., Alam, M. I. (2012) Advances in conversion of hemicellulosic biomass to furfural and upgrading to biofuels. *Catal. Sci. Technol.* **2**, 2025-2036.
- ECA (2016) Tematsko izvješće br. 18/2016.: Sustav EU-a za certifikaciju održivih biogoriva, ECA-European Court of Auditors, <<http://www.eca.europa.eu/hr/Pages/DocItem.aspx?did=37264>> Pristupljeno 15. lipnja 2017.
- Fan L. T., Gharpuray M. M., Lee Y. H. (2011) Cellulose Hydrolysis, Biotechnology Monographs 3, Springer, Njemačka.
- Faraco, V. (2013) Lignocellulose Conversion, Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production. Springer, Berlin.
- Galbe, M., Zacchi, G. (2007) Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Adv. Biochem. Engin/ Biotechnol.* **108**, 41-65.
- Govedarica, D. (2016) Predobrada kukuruznih oklasaka za proizvodnju bioetanola. Završni rad, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Gulati, M., Kohlmann, K., Ladisch, M. R., Hespell, R., Bothast, R. J. (1996) Assessment of ethanol production options for corn products. *Bioresource. Technol.* **58**, 253-264.
- Guo, M., Weiping, S., Buhain, J. (2015) Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **42**, 712-725.

## Literatura

Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., Mayfield, S. (2014) Biofuels from algae: challenges and potential. Taylor & Francis, London.

Harmsen, P., Lips, S., Bakker, R. (2013) Pretreatment of lignocellulose for biotechnological production of lactic acid. *Wageningen UR Food & Biobased Research*. **1384**.

Helle, S., Cameron, D., Lam, J., White, B., Duff, S. (2003) Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. *Enzyme. Microb. Tech.* **33**, 786-792.

Helle, S., Cameron, D., Lam, J., White, B., Duff, S. (2003) Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. *Enzyme. Microb. Tech.* **33**, 786-792.

Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, R. L., Howars, S. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyma production. *Afr. J. Biotechnol.* **12**, 602-619.

Hu, R., Lin, L., Liu, T., Liu, S. (2010) Dilute sulfuric acid hydrolysis of sugar maple wood extract at atmospheric pressure. *Bioresource Technol.* **101**, 3586-3594.

Isikgor, H. F., Becer. C. R. (2015) Lignocellulosic Biomas: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Polym. Chem-UK*. **6**, 4497-4559.

Ivančić Šantek, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek, B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kem. Ind.* **65**, 25-38.

Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., Ravindra, P. (2016) *Renew. Sust. Energ. Rev.* **65**, 756-769.

Jonsson, L. J., Martin, C. (2015) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource. Tehnol.* **199**, 103-112.

Jönsson, L., J., Alriksson, B., Nilvebratnr, N. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitor and detoxification. *Biotechnol. Biofuels.* **6:16**, 3-10.

Kang, Q., Appels, L., Tan, T., Dewil, R. Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Current Findings Determine Research Priorities. *Sci. World. J.* **2014:13**

## Literatura

Khan, T. S., Mubeen, U. (2012) Wheat Straw: A Pragmatic Overview. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* **4(6)**, 673-675.

Koh, P. L., Ghazoul, J. (2008) Biofuels, biodiversity and people: Understanding the conflict and finding opportunities. *Biol. Conserv.* **141**, 2450-2460.

Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., Stroeve, P. (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **48 (8)**, 3713-3729.

Lauder, A. (2016) Predobrada kukuruzovine za proizvodnju bioetanol. Završni rad, Prehrabmbeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill, E., Ahmad, M. N. M., Rooney, D. W., Walker, G., M. (2009) Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chem. Eng. J.* **156**, 395-403.

Mabee W., Saddler J., Sims R., Taylor M. (2008) International Energy Agency, From 1st- to 2nd- Generation Biofuel Technologies, OECD/IEA, Francuska.

McCromick, R. L. (2016) High Octane Fuels: Benefits and Challenges, NREL, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Co. <[https://cleancities.energy.gov/files/u/news\\_events/document/document\\_url/158/CC\\_HOF\\_Webinar\\_Combined.pdf](https://cleancities.energy.gov/files/u/news_events/document/document_url/158/CC_HOF_Webinar_Combined.pdf)> pristupljeno 20.lipnja 2017.

Modig, T., Liden, G., Taherzadeh, MJ. (2002) Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.* **363**, 769-776.

Moiser, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Mark, H., Ladisch, M. (2004) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource. Tehnol.* **96**, 673-686.

Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M., Ardjmand, M. (2013) Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **22**, 77-93.

Morales, M., Quiintero, J., Conejeros, R., Aroca, G. (2014) Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Enviromental impact and energy balance. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **42**, 1349-1361.

## Literatura

Morikawa, Y., Zhao, X., Liu, D. (2014) Biological co-production of ethanol and biodiesel from wheat straw: a case of dilute acid pretreatment. *RCS Adv.* **4**, 37878-37888.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzaple, M., Ladisch, M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource. Tehnol.* **96**, 673-686.

Mousdale, D. M. (2008) *Biofuels: Biotechnology, Chemistry and Sustainable Development*, Taylor & Francis, London.

Mušak, L. (2016) Proizvodnja etanola na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru. Diplomski rad, Prehrambeno- biotehnološki fakultet Sveučiliša u Zagrebu.

Mutwil, M., Debolt, S., Persson, S. (2008) Cellulose synthesis: a complex complex. *Curr. opin. Plant. Biol.* **11(3)**, 252-257.

Nail, S. N., Vaibhav, V. G., Prasant, K. R., Dalai, A. K. (2010) Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14**, 578-597.

Nguyen, Q., Bowyer, J. (2017) *Global production of second generation biofuels: Trends and Influences*. Dovetail Partners, Inc., Minneapolis.

Nieves, R. A., Ehrman, C. I., Adney, W. S., Elander, R. T., & Himmel, M. E. (1997). Survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. *World J. Microb. Biot.* **14(2)**, 301-304.

Okamoto, K., Uchii, A., Kanawaku, R., Yanase, H. (2014) Bioconversion of xylose, hexose and biomass to ethanol by a new isolate of the white rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *Springer Plus.* **3**, 121-130.

Olafsson, K., Bertilsson, M., Liden, G. (2008) A short review on SSF- an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks (objavljeno online 1. svibnja, 2008) doi:10.1186/1754-6834-1-7.

Olsson L., Hanh- Hägerdal B., (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 312-331.

## Literatura

Palmqvist, E., Hanhn-Hagerdal, B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technol.* **74**, 17-24.

Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S. C., Dussap, C-G., Gnansounou, E. (2011) *Biofuels Alternative Feedstocks and Conversion Processes*. Elsevier Inc, Amsterdam.

Pavlečić, M. (2013) Proizvodnja etanola na različitim međuproduktima šećerne repe i matematičko modeliranje tih procesa. Doktorska dizertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Pelkmans, L., Kessels, K., Bole, T. (2014) Induced market disturbances related to biofuels. Report D2.2 of ELOBIO subtask 2.3.URL: [http://www.elobio.eu/fileadmin/elobio/user/docs/Report\\_ELOBIO\\_subtask\\_2\\_3v6.pdf](http://www.elobio.eu/fileadmin/elobio/user/docs/Report_ELOBIO_subtask_2_3v6.pdf).(27. 7. 2014.).

Rass-Hansen, J., Falsig, H., Jorgensen, B, Christensen, C. H. (2007) Perspective Bioethanol: fuel or feedstock. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **82**, 329-333.

Ratnaweera, D. R., Saha, D., Pingali, S. V., Labbe, N., Naskar, A. K., Dadmun, M. (2015) The impact of lignin source on its self-assembly in solution. *RSC Adv.* **5**, 67258-67266.

Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, L. M., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Jackson, R. B. (2011) *The Structure and Function of Large Biological Molecules*. Pearson Education, Inc. London.

Rezić, T. (2012) *Industrijska biotehnologija, Biotehnološka Proizvodnja Biogoriva*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., Wu, Y. V. (2005) Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochem.* **40**, 3693-3700.

Sanchez, O. J., Cordona C. A. (2007) Trends in biotechnological production off elethanol from different feedstocks. *Bioresource Technol.* **99**, 5271-5295.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Co.<<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>, 2008> .pristupljeno 20. ožujka 2017.



## Literatura

- Sun, Y., Cheng, J. (2001) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* **83**, 1-11.
- Tishler, Y., Samach, A., Rogachev, I., Elbaum, R., Levy, A. A. (2015) Analysis of Wheat Straw Biodiversity for Use as a Feedstock for Biofuel Production. *Bioenerg. Res.* **8**.
- Turner, D., Xu, H., Cracknell, R. F., Natarajan, V., Chen, X. (2011) Combustion performance of bio-ethanol at various blend ratios in a gasoline direct injection engine. *Fuel.* **90**, 1999-2006.
- Van der Pol, E. C., Bakker, R. R., Baets, P., Eggink, G. (2014) By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 9579-9593.
- Van Dongen, F.E.M., Van Eylen, D., Kabel, M.A. (2011) Characterization of substituents in xylans from corn cobs and stover. *Carbohyd. Polym.* **86**, 722-731.
- Vassilev, S., Vassileva, G. C., Vassilev, V. S. (2015) Advantages and disadvantages of composition and properties of biomass in comparison with coal: An overview. *Fuel.* **158**, 330-350.
- Wooley, R. J., Ruth, M., Glassner, D., Sheehan, J. (1999) Process design and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development. *Biotechnology Progress.* **15**, 794-803.
- Yuksel, F., Yuksel, B. (2004) The use of ethanol-gasoline blend as a fuel in an SI engine. *Renew. Energ.* **29**, 1181-1191.
- Zhang, J., Hu, B. (2014) Microbial Lipid Production from Corn Stover via *Mortierella isabellina*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**, 574-586.
- Zhang, K., Pei, Z., Wang, D. (2015) Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review. *Bioresource. Tehnol.* **199**, 21-23.
- Zhang, L., Liu, Y., Niu, X., Liu, Y., Liao, W. (2012) Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 and corresponding enzymatic hydrolysis. *Biomass. Bioenergy.* **37**, 16-24.

## Literatura

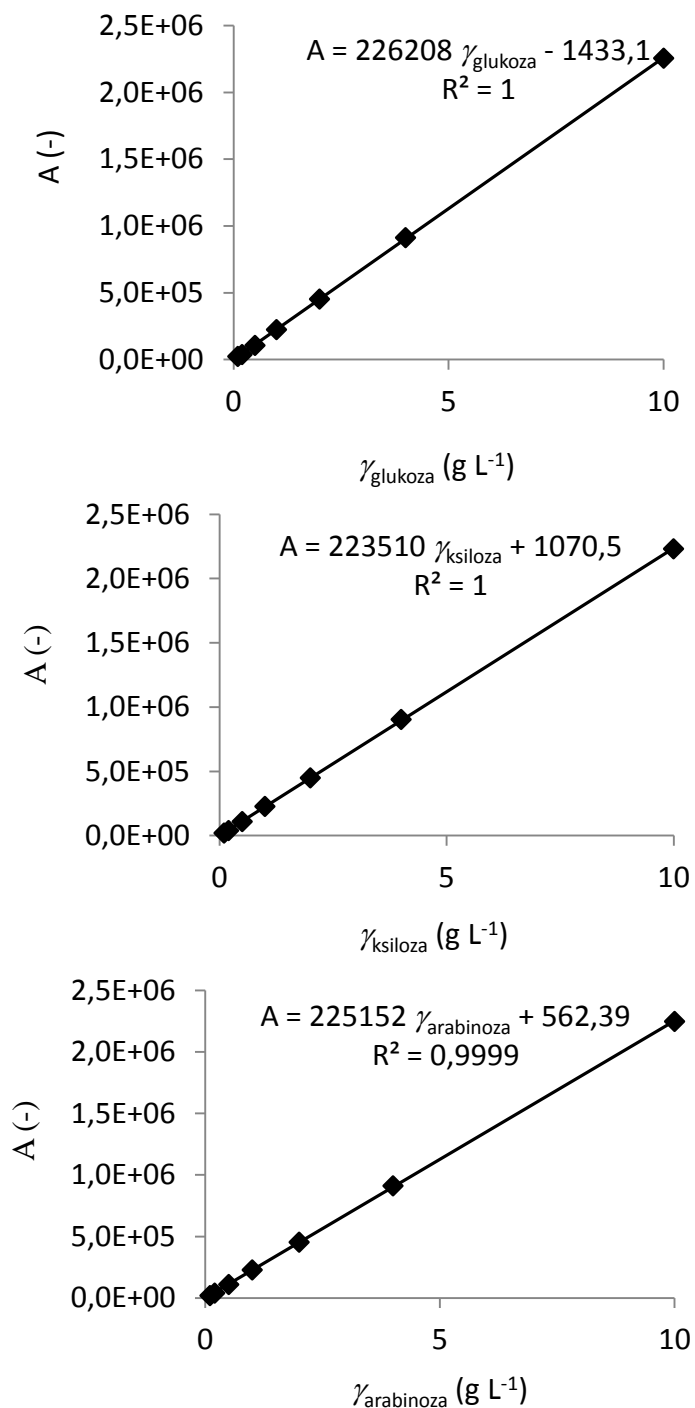
Zhu, J. Y., Pan, X. J., Wang, G. S., Gleisner, R. (2009) Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. *Bioresource Technol.* **8**, 2411-2418.

Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., Vinzant, T., Schell, D. J., McMillan, J. D., Zhang, Y. H. P. (2009) Comparative Study of Corn Stover Pretreated by dilute Acid and Cellulose Solvent-Based Lignocellulose Fractionation: Enzymatic Hydrolysis, Supramolecular Structure and Substrate Accessibility. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 715-724-

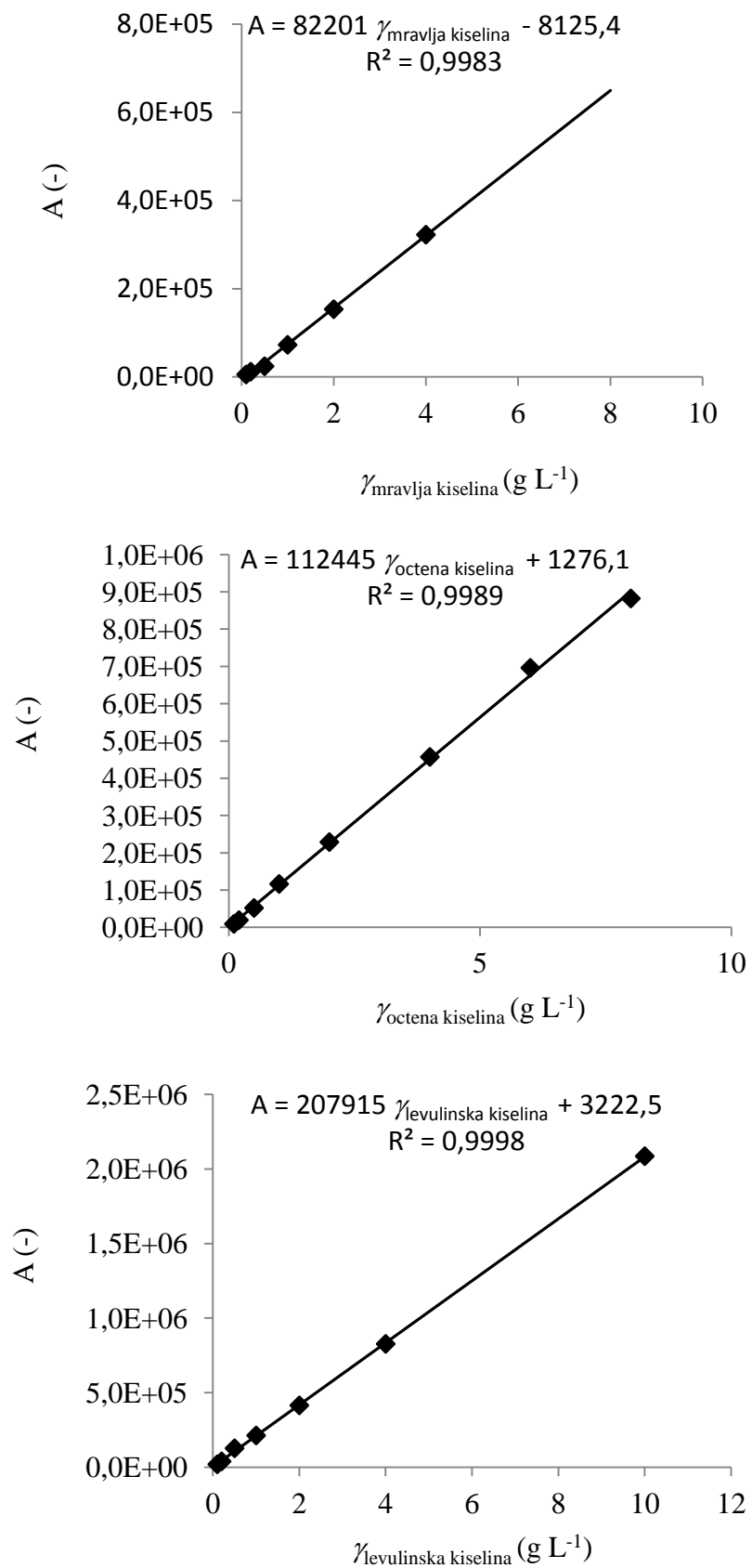
**PRILOZI**

## 7. PRILOZI

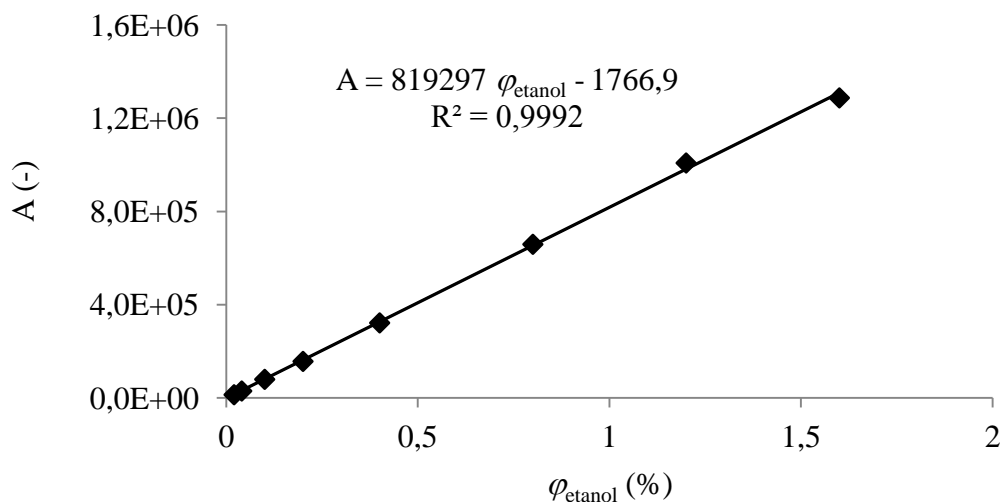
### 7.1. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije ugljikohidrata i proizvoda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)



Slika 31. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije glukoze, ksiloze i arabinoze

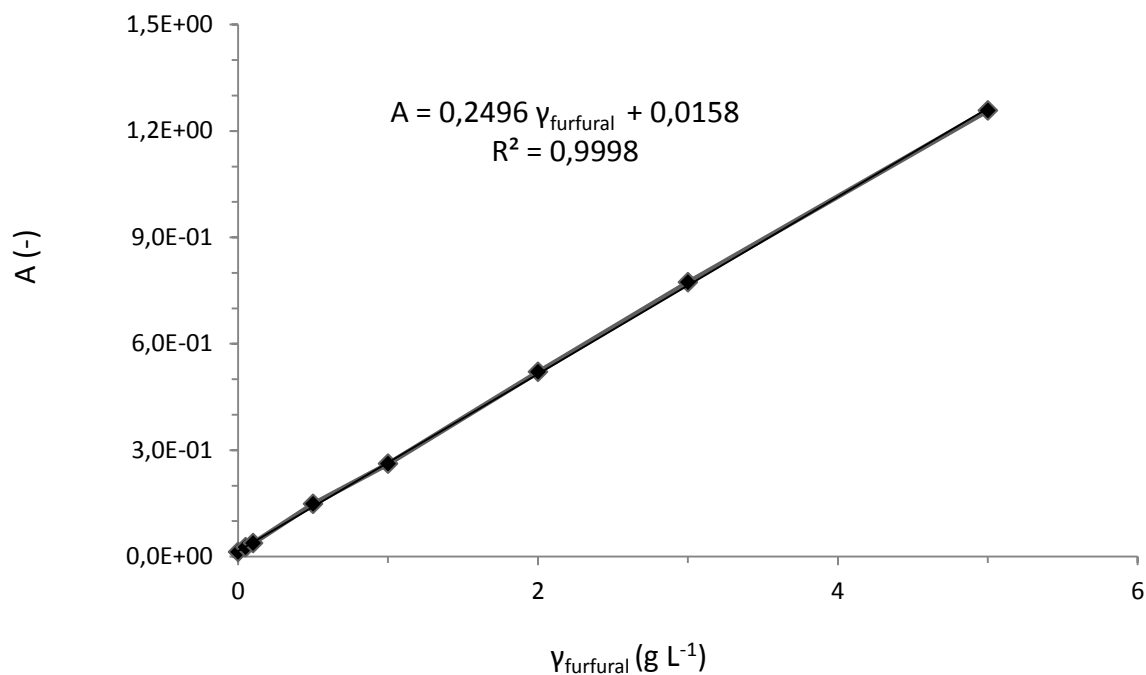


**Slika 32.** Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije mrvlje, octene i levulinske kiseline



**Slika 33.** Baždarni dijagram za određivanje volumnog udjela etanola

**7.2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije furana tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)**



**Slika 34.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije furana