



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Doktorska disertacija

**RAZGRADNJA LIGNOCELULOZNEGA MATERIALA
TRDNIH ORGANSKIH ODPADKOV Z GLIVO *PLEUROTUS
OSTREATUS* PRED PROCESOM ANAEROBNE
FERMENTACIJE V TRDNEM STANJU**

december, 2015

Nataša Belšak Šel



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Nataša Belšak Šel

**RAZGRADNJA LIGNOCELULOZNEGA MATERIALA
TRDNIH ORGANSKIH ODPADKOV Z GLIVO *PLEUROTUS*
OSTREATUS PRED PROCESOM ANAEROBNE
FERMENTACIJE V TRDNEM STANJU**

Doktorska disertacija

Maribor, 2015



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Razgradnja lignoceluloznega materiala trdnih organskih odpadkov z glivo *Pleurotus ostreatus* pred procesom anaerobne fermentacije

Doktorska disertacija

Študent: Nataša Belšak Šel
Študijski program: Kemija in kemijska tehnika
Predvideni znanstveni naslov: doktorica znanosti
Mentor: red. prof. dr. Maja Leitgeb
Komentor: izr. prof. dr. Albin Pintar

Maribor, 2015

Kazalo

Kazalo	I
Zahvala	III
Povzetek.....	IV
Abstract.....	V
Seznam tabel.....	VI
Seznam slik.....	VII
Uporabljeni simboli in kratice	IX
1 Uvod.....	1
1.1 Opredelitev problema.....	2
1.2 Pregled stanja znanosti.....	3
1.3 Doktorska teza.....	4
1.4 Namen in cilji.....	5
2 Teoreti ni del.....	6
2.1 Lignocelulozna biomasa.....	6
2.1.1 Sestava in struktura lignocelulozne biomase.....	6
2.1.2 Predobdelava lignocelulozne biomase.....	10
2.1.3 Lignocelulozni encimi in njihova vloga pri razgradnji lignoceluloze	12
2.1.4 Višje glive in njihova vloga pri razgradnji lignoceluloze.....	16
2.2 Anaerobna fermentacija za proizvodnjo metana.....	17
2.2.1 Potek anaerobne fermentacije.....	19
2.2.2 Dejavniki, ki vplivajo na proces anaerobne fermentacije.....	21
2.3 Osnovni koncept na rtovanja eksperimentov.....	23
2.3.1 Na rtovanje eksperimenta s Taguchi metodo.....	24
3 Eksperimentalni del.....	26
3.1 Materiali	26
3.1.1 Lignocelulozna biomasa	26
3.1.2 Pšeni ni otrobi	26
3.1.3 Vcepek glive <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
3.1.4 Anaerobna mikrobnna biomasa	27
3.2 Metode dela	28
3.2.1 Test biometanskega potenciala s sistemom AMPTS.....	28
3.2.2 Anaerobna fermentacija v strnjenem sloju	35
3.2.3 Proizvodnja lignoceluloznih encimov na trdnih gojiš ih z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i> in ekstrakcija encimov	39
3.2.4 Optimizacija sestave gojiš a za proizvodnjo lakaz glive <i>P. ostreatus</i> po Taguchi metodi	39
3.2.5 Saharifikacija LB in ostanka po anaerobni fermentaciji z encimskim ekstraktom glive <i>Pleurotus ostreatus</i>	40
3.3 Analizne metode.....	42
3.3.1 Dolo anje suhe snovi (SS) in organske snovi (OS).....	42
3.3.2 Kemijska potreba po kisiku (KPK)	42
3.3.3 Elementna C, H, N in S sestava.....	43
3.3.4 pH vrednost.....	43
3.3.5 Dolo anje hlapnih maš obnih kislin v izcedni vodi s plinsko kromatografijo....	43
3.3.6 Dolo anje vsebnosti celotnega dušika in celotnega organskega ogljika v izcedni vodi	43
3.3.7 Dolo anje alkalnosti izcedne vode	44

3.3.8	Spremljanje sestave bioplina iz pilotnih reaktorjev s prenosnim merilnikom za analiziranje deponijskega plina.....	44
3.3.9	Spremljanje sestave bioplina iz sistema AMPTS II na plinskem kromatografu.....	44
3.3.10	Določanje encimskih aktivnosti	45
3.3.11	Določanje vsebnosti sladkorjev po encimski hidrolizi	51
4	Rezultati in diskusija.....	52
4.1	Določitev biometanskega potenciala s sistemom AMPTS II	52
4.1.1	Karakterizacija inokuluma	52
4.1.2	Karakterizacija substratov	52
4.1.3	Karakterizacija testnih mešanic	54
4.1.4	pH vrednost testnih mešanic	55
4.1.5	Celokupna proizvodnja bioplina	55
4.1.6	Biometanski potencial in redukcija OS in KPK	58
4.1.7	Izplen metana	59
4.1.8	Izkoristek proizvodnje metana	60
4.2	Anaerobna fermentacija v pilotnem sistemu	61
4.2.1	Karakterizacija substratov na vhodu in izhodu procesa anaerobne fermentacije	61
4.2.2	Temperaturni profil v reaktorjih med procesom anaerobne fermentacije.....	62
4.2.3	Vpliv pretakanje izcedne vode na pH vrednosti izcedne vode	63
4.2.4	Vpliv pretakanja izcedne vode na sestavo bioplina	64
4.2.5	Redukcija OS in celokupna proizvodnja bioplina v reaktorju pilotnega sistema	67
4.2.6	Bioplinski in biometanski potencial.....	68
4.2.7	Vsebnost KPK, celotnega dušika, celotnega organskega ogljika, alkalnosti in hlapnih maščobnih kislin v izcedni vodi	69
4.2.8	Kurilna vrednost metana in energetska bilanca pilotnega sistema	71
4.3	Rast glive na različnih mešanicah PO in LB	73
4.4	Vpliv sestave substrata in inkubacijskega časa na encimske aktivnosti.....	73
4.5	Optimizacija proizvodnje lakaz glive <i>P. ostreatus</i> z uporabo Taguchi metode	81
4.5.1	Vpliv parametrov na aktivnost lakaz	81
4.5.2	Analiza variance (ANOVA)	83
4.5.3	Potrditveni test	85
4.6	Encimska hidroliza LB in ostanka po fermentaciji.....	87
5	Razprava	90
6	Zaključek	93
7	Literatura.....	94
8	Življenjepis	101
	Izjava doktorskega kandidata.....	102
	Bibliografija kandidata.....	103

Zahvala

Zahvaljujem se vsem, ki so omogoili in so mi bili v podporo pri nastanku te doktorske disertacije, predvsem pa Javni agenciji Republike Slovenije za spodbujanje podjetništva, inovativnosti, razvoja, investicij in turizma (SPIRIT) za finančno pomoč.

Zahvaljujem se mentorici red. prof. dr. Maji Leitgeb, somentorju prof. dr. Albinu Pintarju in raziskovalnemu mentorju dr. Štefanu Klančanu za usmerjanje ter strokovne in znanstvene nasvete. Posebno zahvalo namenjam doc. dr. Dušanu Klinarju za nesebično pomoč pri izvajanju raziskovalnega dela ter strokovno pomoč pri pripravi disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr. Albinu Pintarju, da mi je omogoil izvajanje raziskav v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo (Kemijski inštitut) ter zaposlenim v laboratoriju za pomoč pri izvajanju eksperimentov in analiz.

Iskrena hvala Komunalnemu podjetju Ptuj za omogočeno izvajanje raziskav in analiz v njihovem laboratoriju. Posebno zahvalo namenjam dr. Brigiti Tepuš in ostalim zaposlenim v laboratoriju, ki so mi bili vedno pripravljeni pomagati.

Za podporo in pomoč se zahvaljujem vsem sodelavcem ZRS Bistra Ptuj. Ob tem se zahvaljujem tudi družini za izkazano podporo pri študiju. Posebna zahvala je namenjena Bojanu, ki mi je priskočil na pomoč pri vsaki tehnični težavi, ter pri izdelavi reaktorskega sistema. Zahvala velja tudi za njegovo moralno podporo skozi celotni študij.

Povzetek

Omejeni viri, visoke cene in okoljski vpliv fosilnih goriv narekujejo razvoj alternativnih virov energije, med katere spada tudi proizvodnja energije iz lignocelulozne biomase. Lignocelulozna biomasa (LB) kmetijskih, vrtnih in gozdarskih ostankov se v veliki količini kopi in na regionalnem zbirnem centru za ravnanje z odpadki, kjer jo uporabijo v procesu kompostiranja. Z našo nalogo smo raziskali možnosti proizvodnje bioplina iz lokalno zbrane LB. S tem namenom smo optimirali in nadgradili proces anaerobne fermentacije LB za pridobitev biometana, obnovljivega vira energije. Izdelali smo pilotni sistem šaržnih reaktorjev s strnjanim slojem in križnim pretakanjem izcedne vode, z namenom simulacije procesa na ustrezni velikosti glede na vstopno biomaso.

Pri izvedbi eksperimentov v reaktorjih na pilotnem merilu, smo glavni poudarek namenili študiji vpliva pretakanja izcedne vode med reaktorji na proizvodnjo bioplina. Rezultati tovrstnih poskusov so pokazali, da je pretakanje izcedne vode med reaktorji ključnega pomena za stabilnost procesa in povečano proizvodnjo bioplina.

Raziskave kažejo, da je proizvodnjo bioplina iz LB možno povečati z učinkovito predobdelavo. Nadgradnjo procesa anaerobne fermentacije smo izvedli z biološko predobdelavo LB. In sicer smo glivo *P.ostreatus* gojili direktno na LB, v nadaljevanju smo za razgradnjo LB uporabili le encime glive. V laboratorijskem sistemu AMPTS smo določili biometanski potencial LB in LB prerašeni z glivo. Postopek predobdelave LB, pri katerem smo glivo gojili direktno na vzorcih LB, se je izkazal za učinkovitejši, saj je bil biometanski potencial vzorcev prerašeni z glivo mnogo nižji od biometanskega potenciala LB, ki ni bil izpostavljen nobeni predobdelavi.

Naše raziskave smo nato nadaljevali v smeri gojenja glive na trdnem gojišču, sestavljenem iz pšeničnih otrobov in lignocelulozne biomase, in nato pridobivanja hidrolitičnih in oksidativnih encimov. Iz rezultatov encimskih aktivnosti smo ugotovili, da je gliva *P. ostreatus*, proizvedla celulitične encime v manjših količinah, medtem ko so bile lakaze, ki spadajo med ligninolitične encime, proizvedene v velikih količinah. Glede na to, da veljajo lakaze tudi za industrijsko zanimive encime, smo z optimizacijo po Taguchi metodi raziskovali vpliv sestave gojišča na produktivnost lakaz. Optimizacija gojišča s Taguchi ortogonalno matriko L18 ($2^1 \times 3^7$) se je izkazala za uspešno metodo, s katero smo pridobili podatke za sestavo gojišča na katerem izloči gliva *P. ostreatus* največ lakaz.

Za primerjavo učinkovitosti razgradnje LB z encimskim ekstraktom, pridobljenim iz gojišča *P. ostreatus*, smo uporabili dva komercialna encima. Rezultati so pokazali, da je bil encimski ekstrakt učinkovit pri razgradnji LB, kakor tudi pri razgradnji trdnega ostanka po fermentaciji.

Ključne besede: lignocelulozna biomasa, anaerobna fermentacija, lignocelulozni encimi, *Pleurotus ostreatus*, encimska hidroliza

UDK: [602.42:577.152.3]:630*86(043.3)

Abstract

The limited resources, high cost and the environmental impact of fossil fuels require the development of alternative energy sources, which include energy production from lignocellulosic biomass (LB). LB from agricultural, garden and forestry residues has been accumulated in large quantities at a regional collection centre for waste management, where it is used in the composting process. In our study, we discussed the possibility of biogas production from locally collected LB. In this purpose, we optimized and upgraded the anaerobic digestion process of LB for biomethane production, a renewable energy source. We have made our system of batch reactors with fluidized bed and leachate recirculating system, and we followed the principle of cost effectiveness production of reactors system.

In carrying out the experiments in the reactors system on a pilot scale, the emphasis has been given to the study of leachate recirculation impact between reactors on the biogas production. The results of these experiments showed the crucial importance of leachate recirculation between reactors on the process stability and increased biogas production.

Researchers have shown that the production of biogas from the LB can be enhanced by an effective pre-treatment. We have upgraded our anaerobic digestion process with LB biological pre-treatment. Biological pre-treatment has been carried out with *P. ostreatus* cultivation directly on LB samples and in the continuation of pre-treatment study only the enzymes from *P. ostreatus* have been used. Biomethane potential has been determined by laboratory AMPTS system for LB and pretreated LB, respectively. Pre-treatment process with direct fungi cultivation on LB has been proved as ineffective since the biomethane potential of these samples has been much lower than the biomethane potential of LB, which has not been treated with any pre-treatment.

We continued our research in the field of fungi cultivation on solid state culture medium composed of wheat bran and LB with the aim of hydrolytic and oxidative enzymes production. From the results of enzyme activities, we found out that *P. ostreatus* has been, in our case, poor cellulolytic enzymes producer, but on the contrary laccases, known as enzymes for lignin degradation, have been produced in large quantities. According to the possibility of laccase application at industrial scale, we have been carried out optimization of culture medium for laccase production with Taguchi method. Optimization of culture medium with Taguchi orthogonal array L18 ($2^1 \times 3^7$) has been proved as a successful method for obtaining the data of culture medium composition, which served as medium for maximum laccase production of *P. ostreatus*.

To compare the efficiency of LB degradation of enzyme extract obtained from *P. ostreatus* cultivation, we have been used two commercial enzymes. The results showed an efficiency of enzyme extract in the LB and digestate degradation, respectively.

Key words: lignocellulosic biomass, anaerobic digestion, lignocellulosic enzymes, *Pleurotus ostreatus*, enzymatic hydrolysis

UDK: [602.42:577.152.3]:630*86(043.3)

Seznam tabel

Tabela 2.1: Vsebnost celuloze, hemiceluloze in lignina za razli ni lesni odpad [9].	7
Tabela 2.2 Razli ne tehnike predobdelave.	11
Tabela 3.1: Oznake in karakteristike rasti glive na vzorcih, uporabljenih v sistemu AMPTS II za dolo itev biometanskega potenciala.	28
Tabela 3.2: Faktorji in nivoji eksperimentalnega na rtovanja	40
Tabela 4.1: Lastnosti inokuluma uporabljenega v sistemu AMPTS	52
Tabela 4.2: Vsebnost SS, OS, KPK ter H_c° vzorcev uporabljenih v sistemu AMPTS.	52
Tabela 4.3: CHNS analiza vzorcev uporabljenih v sistemu AMPTS	53
Tabela 4.4: Karakteristike testnih mešanic.	54
Tabela 4.5:Za etna in kon na pH vrednost testnih mešanic.	55
Tabela 4.6: Bioplinski in biometanski potencial substratov.	58
Tabela 4.7: Redukcija OS in KPK med procesom anaerobne fermentacije v sistemu AMPTS.	59
Tabela 4.8:Izplen metana glede na reducirano KPK.	59
Tabela 4.9 Izkoristek proizvodnje metana.	60
Tabela 4.10:Vsebnost SS, OS, pH, dušika po Kjeldahlu in celotnega organskega ogljika v vhodnem in izhodnem vzorcu anaerobne fermentacije.	61
Tabela 4.11: Redukcija OS in celokupna proizvodnja bioplina in metana v reaktorju pilotnega sistema.	67
Tabela 4.12: Bioplinski (BPP) in biometanski potencial (BMP) LB v pilotnem sistemu.	68
Tabela 4.13: Kurilna vrednost in izkoristek vzorca anaerobne fermentacije v trdnem stanju.	71
Tabela 4.14: Energetska bilanca reaktorja iz pilotnega sistema	72
Tabela 4.15: Eksperimentalni na rt z uporabo Taguchi L18 ortogonalne matrike z rezultati aktivnosti lakaz.	82
Tabela 4.16: Tabela srednjih vrednosti (“Ve je je boljše”).	83
Tabela 4.17: Analiza variance srednjih vrednosti (ANOVA)	84
Tabela 4.18: Optimalni pogoji za proizvodnjo lakaz in njihov prispevek	85
Tabela 4.19: Rezultati potrditvenega eksperimenta.	86
Tabela 4.20: Specifi ne aktivnosti encimov, uporabljenih za test encimske hidrolize.	87
Tabela 4.21: Vsebnost glukoze po encimski hidrolizi.	88

Seznam slik

Slika 2.1:Struktura lignoceluloze [22].	7
Slika 2.2: Kemijska struktura celuloze [25].	8
Slika 2.3: Komponente hemiceluloze [25].	8
Slika 2.4: Fenilpropanske predhodne enote polimernega lignina [29].	9
Slika 2.5: Shema sestave lignina golosemenk, ki predstavlja razli no vezavo med enotami fenil propana [4].	10
Slika 2.6: Shematski prikaz hidrolize amorfne in mikro kristalini ne celuloze z ne kompleksnim sistemom celulaz. Polni kvadrati predstavljajo reducirane konce, prazni kvadrati predstavljajo ne reducirane konce [38].	13
Slika 2.7: Mehanizem hidrolize celuloze s celulazami [39].	13
Slika 2.8: Kemi na struktura in razgradnja hemiceluloze [41].	14
Slika 2.9: Bakrovi centri v lakazi [44].	15
Slika 2.10: Katalitcki cikel oksidacijskega sistema lakaze – mediator [45].	16
Slika 2.11: Potek anaerobne fermentacije (hidroliza, acidogeneza, acetogeneza in metanogeneza).	18
Slika 2.12: Vpliv temperature na stopnjo procesa anaerobne fermentacije rtkana rta predstavlja potek anaerobne fermentacije pri vmesnih temperaturah med mezofilnim in termofilnim podro jem [82].	22
Slika 2.13: Smernice eksperimentalnega na rtovanja (povzeto po Montgomery [90]).	24
Slika 3.1: LB iz CERO Gajke, razli na sestava v razli nih asovnih obdobjih.	26
Slika 3.2: Micelij glive <i>P. ostreatus</i> PLAB gojen na PDA mediju, uporabljen kot inokulum na gojiš ih v Erlenmajericah.	27
Slika 3.3: Sistem AMPTS II. (a) <i>on-line</i> beleženje koli ine nastalega bioplina, (b) termostatirana vodna kopel z reaktorji, (c) enota za odvzem vzorcev bioplina, (d) plovna celica za merjenje volumna nastalega bioplina.	29
Slika 3.4: Shema masne bilance anaerobne fermentacije izražena z vrednostmi KPK.	33
Slika 3.5: Skica reaktorja.	36
Slika 3.6: Pilotni sistem treh reaktorjev anaerobne fermentacije med izvajanjem anaerobne fermentacije.	37
Slika 3.7: Shema pretakanja izcedne vode med reaktorji.	37
Slika 3.8:Shema energetske bilance v pilotnem sistemu.	39
Slika 3.9: Izvedba encimske hidrolize v scintilacijskih vialah.	41
Slika 3.10: Spektrofometer Spectroquant NOVA 60 (Merck) z grelno komoro Spectroquant TR 420 (Merck) za dolo anje KPK.	43
Slika 3.11:Umeritvena krivulja za dolo anje CMCaz.	46
Slika 3.12: Umeritvena krivulja za dolo anje FPaz.	47
Slika 3.13: Umeritvena krivulja za dolo anje aktivnosti -glukozidaz.	48
Slika 3.14: Umeritvena krivulja za dolo anje ksilanaz.	49
Slika 3.15: Umeritvena krivulja za dolo anje sladkorjev po encimski hidrolizi.	51

Slika 4.1: Celokupna proizvodnja bioplina izražena na liter testne mešanice.	56
Slika 4.2: Dnevna proizvodnja bioplina za preizkušane vzorce v sistemu AMPTS.	57
Slika 4.3: Bioplinski potencial vzorcev izražen na OS substratov.	57
Slika 4.4: Temperatura v reaktorjih pilotnega sistema med procesom anaerobne fermentacije v termofilnem temperaturnem območju.	62
Slika 4.5: Vrednost pH izcedne vode v reaktorjih anaerobne fermentacije iz 2 zaporednih serij.	63
Slika 4.6: Delež CH ₄ in CO ₂ v bioplinu iz reaktorjev anaerobne fermentacije 2 zaporednih serij.	64
Slika 4.7: Vsebnost H ₂ S v enem reaktorju pilotnega sistema anaerobne fermentacije.	65
Slika 4.8: Vpliv pretakanja izcedne vode na vrednost pH v izcedni vodi in na deleže CO ₂ in CH ₄ v bioplinu.	66
Slika 4.9: Dnevna in kontinuirana proizvodnja bioplina in metana v reaktorju pilotnega sistema.	67
Slika 4.10: Vsebnost KPK, dušika, ogljika in alkalnosti v izcedni vodi.	69
Slika 4.11: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin v izcedni vodi.	70
Slika 4.12: Primerjave rasti micelija glive <i>P. ostreatus</i> na tretji dan gojenja za substrat z najnižjim deležem LB (a) in z najvišjim deležem LB (b). Primerjava Slike 4.12 (a) in 4.12 (c) prikazuje hitrost rasti micelija po desetih dneh inkubacije.	73
Slika 4.13: Encimske aktivnosti FPaz, CMCaz, -glukozidaz in ksilanaz dosežene pri gojenju <i>P. ostreatus</i> na PO1 gojišču.	74
Slika 4.14: Encimske aktivnosti FPaz, CMCaz, -glukozidaz in ksilanaz dosežene pri gojenju <i>P. ostreatus</i> na PO2 gojišču.	74
Slika 4.15: Encimske aktivnosti FPaz, CMCaz, -glukozidaz in ksilanaz dosežene pri gojenju <i>P. ostreatus</i> na PO3 gojišču.	75
Slika 4.16: Encimske aktivnosti FPaz dosežene pri gojenju <i>P. ostreatus</i> na PO1, PO2 in PO3 gojiščih.	75
Slika 4.17: Encimske aktivnosti CMCaz dosežene pri gojenju <i>P. ostreatus</i> na PO1, PO2 in PO3 gojiščih.	76
Slika 4.18: Encimske aktivnosti -glukozidaz dosežene pri gojenju <i>P. ostreatus</i> na PO1, PO2 in PO3 gojiščih.	77
Slika 4.19: Encimske aktivnosti ksilanaz dosežene pri gojenju <i>P. ostreatus</i> na PO1, PO2 in PO3 gojiščih.	78
Slika 4.20: Encimske aktivnosti lakaz dosežene pri gojenju <i>P. ostreatus</i> na PO1, PO2 in PO3 gojiščih.	79
Slika 4.21: Plastni diagrami interaktivnih interakcij, ki vplivajo na aktivnost lakaz za LB in glukozo (a), LB in pepton (b), glukozo in KH ₂ PO ₄ (c) in kvasni ekstrakt in pepton (d).	85

Uporabljeni simboli in kratice

Simboli

<i>A</i>	absorbanca (-)
<i>c</i>	množinska koncentracija (mol/L)
<i>d</i>	pot žarka (cm)
<i>f</i>	faktor reditve (-)
<i>m</i>	masa (g, kg)
<i>M</i>	molska masa (g/mol)
<i>n</i>	množina (mol)
<i>p</i>	tlak (kPa)
<i>R</i>	splošna plinska konstanta (kPa L/mol K)
<i>t</i>	čas (min, h, dan)
<i>V</i>	volumen (mL, L)

Grški simboli

χ	masna koncentracija (g/L)
Δ	razlika (-)
ϵ	molarni ekstinkcijski koeficient (mol/L cm)
η	izkoristek (%)
λ	valovna dolžina (nm)
ρ	gostota (g/L)
r	premer (m)

Kratice

ABTS	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolilna-6-sulfonska kislina)
Adj. MS	prilagojeno povpreje kvadratov (ang. Adjusted mean squares)
Adj. SS	prilagojena vsota kvadratov (ang. Adjusted sums of squares)
ANOVA	analiza variance (ang. ANalysis Of Variance)
AMPTS	Automatic Methane Potential Test System
BMP	biometanski potencial
BPP	bioplinski potencial
C:N	razmerje med ogljikom in dušikom
DF	prostostna stopnja (ang. degree of freedom)
F-vrednost	povezava faktorja z odzivom
idr.	in drugi
LB	lignocelulozna biomasa

KPK	kemijska potreba po kisiku (mg/L; g/kg)
OS	organska snov (g/kg; %)
P-vrednost	statisti na pomembnost/nepomembnost faktorja
<i>P. ostreatus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
PDA	krompirjev dekstrozni agar (ang. potato dextrose agar)
PO	pšeni ni otrobi
PO ₁ , PO ₂ ,	gojiš a za gojenje glive <i>P. ostreatus</i>
PO ₃	
rpm	obrati na minuto (ang. rotation per minute)
SS	suha snov (g/kg; %)
TKN	celotni dušik po Kjeldahlu
TOC	celotni organski ogljik
TN	celotni dušik

Podpisi

as	anorganska snov
B	bioplin
CH ₄	metan
d	delovni
eks	eksperimentalna
iz	izhod
OS	organska snov
red	redukcija
rz	reakcijska zmes
s	substrat
SS	suha snov
t	teoreti na
tm	testna mešanica
vh	vhod
vz	vzorec

1 Uvod

Med pomembnejše predpogoje za trajnostni razvoj sodi proizvodnja ustreznih goriv iz biomase, ki lahko nadomestijo alternativna fosilna goriva. V mnogih državah se bioplin, proizveden iz odpadnih materialov, že uporablja za proizvodnjo toplote in električne energije, kakor tudi kot gorivo za avtomobile. Bioplin se lahko proizvaja iz skoraj vseh bioloških materialov, vendar frakcije z nizko razgradljivostjo omejujejo količino in nastalega bioplina in s tem znižujejo učinkovitost procesa. Med najbolj razširjen biološki material sodijo lesna biomasa (les listavcev in iglavcev), trave in industrijski, kot tudi kmetijski ostanki. Količina lignocelulozних odpadkov v velikih količinah lahko povzroči ali prispeva k mnogim okoljskim problemom. Po drugi strani pretvorba teh materialov v obnovljiva goriva predstavlja velik potencial za postopno zniževanje uporabe neobnovljivih fosilnih virov (nafta, premog in zemeljski plin) [1]. Glede na kemijsko sestavo, ki vključuje visoko vsebnost sladkorjev, so lahko lignocelulozni odpadki pretvorjeni v številne produkte z dodano vrednostjo, kot so etanol, bioplin, lignin, kot tudi organske kisline in encime [2].

Anaerobna fermentacija je primerna tehnologija za obravnavanje tako trdnih odpadkov kot tudi odpadnih vod in je obravnavana kot tehnologija predelave odpadkov v energijo. Ocenjena je kot energetsko učinkovita in okolju koristna tehnologija za proizvodnjo bioenergije. Omejitve izpustov ogljikovega dioksida in drugih emisij z zakonodajo in subvencije za proizvodnjo energije iz biomase, so prispevali k temu, da je postala tehnologija anaerobne fermentacije privlačnejša in konkurenčnejša tehnologija za opravljanje z odpadki. Biogoriva predstavljajo velik potencial pri trajnostnem razvoju, saj so lahko proizvedena iz lokalno dostopnih obnovljivih virov. Trenutno se zelo obsoja proizvodnja t.i. biogoriv prve generacije, ki zajema proizvodnjo biogoriv iz živilskih pridelkov, trend se nadaljuje v smeri proizvodnje t.i. biogoriv druge generacije, ki se proizvajajo iz kmetijskih in gozdnih ostankov ter energetskih rastlin, ki niso namenjene prehrani [3].

Lignocelulozna biomasa (LB) obsega približno polovico rastlinskih virov proizvedenih s fotosintezo. Sestavljena je iz treh vrst polimerov: celuloze, hemiceluloze in lignina, ki so med seboj prepleteni in kemijsko povezani z ne-kovalentnimi vezmi in s kovalentnimi križnimi povezavami [4]. Lesna biomasa, celuloze, hemiceluloze in lignina, proizvedenih kot stranski proizvod v kmetijstvu in gozdarstvu, se uporabi, ostalo se obravnava kot odpadek. Mnogi organizmi so sposobni razgradnje in rabe celuloze in hemiceluloze kot vir ogljika in energije. Veliko manjša je skupina višjih gliv, ki ima razvito sposobnost razgradnje lignina, ki velja za najupornejšo sestavino v celih stenah rastlin. Te glive so znane kot glive bele trohnobe, ki imajo edinstveno sposobnost učinkovite razgradnje lignina do ogljikovega dioksida. Zraven lignina, so glive bele trohnobe sposobne razgradnje različnih obstojnih onesnaževalcev okolja, kot so klorirane aromatske spojine, heterocikli, aromatski hidrokarbonati, različne barve in sintetični polimeri. Ta sposobnost razgradnje gliv bele trohnobe je posledica močne oksidativne dejavnosti njihovih ligninolitičnih encimov [5].

Obstaja mnogo opisov lignocelulozних encimov glive *P. ostreatus* med gojenjem na različnih lignocelulozних substratih [6]. Lesne glive so saprofiti, kar pomeni, da rastejo na mrtvem in razpadajočem organskem materialu. Med rastjo glivnega micelija in razvojem dozorelih trosnjakov se pojavijo biokemične spremembe, zaradi katerih se za neko zunajcelično izolirane encime, ki razgrajajo netopne snovi v substratih v preproste in topne molekule, ki jih nato uporabijo znotrajcelični encimi v gobi [7]. Glivna razgradnja se odvija zunajcelično zaradi netopnosti lignina, celuloze in hemiceluloze. Lesne glive imajo dva tipa zunajceličnih

encimskih sistemov: hidroliti ni sistem, ki proizvaja hidrolaze, ki so odgovorne za razgradnjo polisaharidov; in edinstven oksidativni, zunajceli ni ligninoliti ni sistem, ki razgrajuje lignin in odpira fenilne obroč. Za glive bele trahome je znano, da ne morejo uporabiti lignina kot edinega vira ogljika in energije. Predvideva se, da glive razlenijo lignin zato, da s tem dobijo omogočen dostop do celuloze in hemiceluloze [8].

Zaradi raznolikosti v sestavi organskih trdnih odpadkov je za večjo učinkovitost procesa anaerobne fermentacije potrebna predobdelava LB. S predobdelavo želimo vplivati na morfološke in strukturne lastnosti materiala ter zmanjšati stopnjo polimerizacije. Z odpiranjem strukture lignina se povečuje razpoložljiva površina substrata, hkrati pa postanejo snovi, ki so ujete v strukturi lignina, organizmom bolj dostopne. Predobdelava mora izpolnjevati naslednje zahteve: izboljšanje razpoložljivosti sladkorjev ali možnost naknadnega nastajanja sladkorjev z encimsko hidrolizo, preprečevanje razgradnje ali izgube ogljikovih hidratov, preprečevanje nastanka stranskih produktov, inhibitornih za nadaljnjo hidrolizo in proces fermentacije mora biti stroškovno učinkovit [9].

1.1 Opredelitev problema

V centru za ravnanje z odpadki (CERO) Gajke na Ptujju se ob ostalih lokalnih frakcijah odpadkov zbirajo tudi lignocelulozni ostanki, zbrani iz lokalnega okolja. Večina del lignocelulozne biomase je sestavljen iz lesne biomase, ki vsebuje obreznine dreves in grmovja, obreznin živih mej, ostankov okrasnih rastlin, pokošene trave, plevela in listja. Razmerje posameznih komponent v LB ni konstantno skozi celotno leto. Moč je odvisna od letnega obseva. Zbrano LB na CERO kompostirajo. Ob kompostu se v procesu aerobne razgradnje z oksidacijo substratov proizvede še ogljikov dioksid in voda ter sprosti se energija v obliki toplote. Alternativno aerobni razgradnji predstavlja anaerobna fermentacija, ki predstavlja biološko razgradnjo organskega materiala v odsotnosti kisika. Izvaja se v reaktorjih, ki zagotavljajo zaprt sistem, ki lahko zagotovi primerne pogoje za anaerobno fermentacijo. V procesu se proizvede bioplin, ki je v glavnem sestavljen iz metana in ogljikovega dioksida, na koncu procesa ostane trdni ostanek po fermentaciji. Iz okoljskega vidika se obravnava tehnologija anaerobne fermentacije za koristnejšo v primerjavi s kompostiranjem, saj predstavlja bioplin iz anaerobne fermentacije alternativo fosilnim gorivom. Poleg tega uporaba LB v anaerobni fermentaciji prispeva k zmanjšanju emisij toplogrednih plinov, saj se pri sistemu anaerobne fermentacije proizvede manj ogljikovega dioksida, kot v sistemu aerobne razgradnje.

1.2 Pregled stanja znanosti

V procesih anaerobne fermentacije LB velja za etna faza hidrolize za stopnjo, ki omejuje hitrost in uinkovitost procesa nastajanja bioplina. To se zgodi zaradi kompleksne strukture LB (celuloza, hemiceluloza, lignin), ki je mikroorganizmi brez predhodne predobdelave niso sposobni predelati. Do danes so bile narejene mnoge študije, ki obravnavajo predobdelave LB, v ve ini primerov se produkti razkroja uporabljajo pri fermentaciji za proizvodnjo etanola, manj je primerov predobdelave LB za uporabo v sistemih anaerobne fermentacije. Za predobdelavo so bile uporabljene razli ne tehnike, ki so vklju evale razli ne fizikalne, kemijske in biološke predobdelave ali kombinacije ve predobdelav.

Encimi, ki razgrajujejo biomaso, so prisotni v reaktorjih anaerobne fermentacije, saj jih proizvajajo mikroorganizmi, ki so prisotni v procesu anaerobne fermentacije. Za izboljšanje razgradnje LB se lahko doda mešanica razli nih encimov, kot so celulaze, hemicelulaze, ligninaze in pektinaze. Encimi se lahko dodajajo na tri razli ne na ine: kot dodatek direktno v reaktor enofaznega sistema anaerobne fermentacije; kot dodatek v reaktor dvofaznega sistema, v katerem poteka stopnja hidrolize in acidifikacije ali v posebnem reaktorju, ki je namenjena encimski predobdelavi. Dodatek encimov v anaerobno fermentacijo je bil obravnavan v mnogih študijah. Obstaja nekaj študij, ki so pokazale, da dodatek encimov neposredno v reaktor nima pomembnega vpliva na proizvodnjo bioplina, saj so encimi po dodatku hitro razgrajeni [10]. Številne študije izvedene v šaržnih procesih anaerobne fermentacije so pokazale, da dodajanje encimov v prvi fazi dvostopenjskega procesa anaerobne fermentacije vodi do nekoliko višje topnosti substratov, kar vodi do višjega doprinosa bioplina. Romano. idr. [11] so preu evali vpliv dodatka celulaz, hemicelulaz in -glukozidaz v sistemu anaerobne fermentacije pšeni ne trave. Anaerobna fermentacija je potekala v šaržnih reaktorjih pri temperaturi 50 °C. Encimi so bili dodani v enofazni sistem fermentacije, pšeni ni travi po kon ani eno fazni fermentaciji in v prvo fazi dvo faznega sistema anaerobne fermentacije. Dodatek encimov je pokazal pozitivne u inke, ko so bili encimi dodani izklju no travi, u inka pa ni bilo zaznati, ko so bili encimi dodani v proces anaerobne fermentacije. Nekatere študije so pokazale, da encimska predobdelava v posebnem reaktorju vodi do višje razgradnje substratov ali višjih doprinosov bioplina v šaržnih testih anaerobne fermentacije, kot na primer predobdelava razli nih kmetijskih ostankov s koktajlom celuliti nih encimov [12].

Vpliv encimske predobdelave na kašo sladkorne pese in ostanke hmelja pred procesom anaerobne fermentacije so preiskovali Zieminski idr. [13]. Uporabili so koktajl ve razli nih encimov. Encimska predobdelava je pokazala pove anje donosnosti bioplina, najve ji porast so dosegli na predobdelani kaši sladkorne pese, kjer se je proizvodnja bioplina pove ala za 88,9 % v primerjavi s proizvodnjo bioplina kaše sladkorne pese brez predobdelave.

Mnogo študij anaerobnih fermentacij v trdnem stanju za LB je bilo izvedenih brez predhodne predobdelave LB. Adhikari idr. [14] so izvedli študijo anaerobne fermentacije v trdnem stanju s križnim pretakanje izcedne vode za organsko frakcijo komunalnih odpadkov. Ugotovili so, da pove anje dnevnega nivoja pretakanja izcedne vode vpliva na povišanje donosnosti metana in skrajšanje zadrževalnega asa. Pod razli nimi pogoji obratovanja so dosegli proizvodnjo biometana od 143 do 240 L CH₄/kg organske snovi (OS). Primerjavo med anaerobno fermentacijo v trdnem in teko em stanju za osem razli nih LB substratov so izvedli Brown idr. [15]. Pri donosnosti metana niso zaznali razlik med teko o in trdno anaerobno fermentacijo. Volumetri na produktivnost biometana je bila od dva do sedem krat višja pri fermentaciji v trdnem stanju v primerjavi s teko o fermentacijo. Biometanski potencial (BMP) je bil višji za ostanke žitaric v primerjavi z BMP za vzorce lesa. Najvišja proizvodnja biometana je bila dosežena za pšeni no slamo, in sicer 123,9 L CH₄/kg OS, najnižja pa za borov les 17,0 L CH₄/kg OS.

1.3 Doktorska teza

Teza predstavljene raziskave je bila, da lahko LB, zbrano v lokalnem okolju, uspešno anaerobno fermentiramo v reaktorjih s strnjenim slojem. Zaradi potrebe po dodatnih metodah obravnavanja stranskih tokov v teko i fermentaciji, smo se omejili na fermentacijo v trdnem stanju v reaktorjih s strnjenim slojem s križnim pretakanjem izcedne vode. Zaradi kompleksnosti sestave LB smo predvidevali, da donosnost bioplina brez predhodne obdelave LB ne bo zadovoljiva. Zaradi spreminjanja sestave LB glede na obdobje v letu, smo predvidevali, da lahko prihaja do sprememb donosnosti bioplina z uporabo LB zbrano v različnih mesecih v letu. Anaerobno fermentacijo smo optimizirali s pretakanjem izcedne vode in nadgradili z biološko predobdelavo LB. Predpostavili smo, da bo pretakanje izcedne vode pozitivno vplivalo na potek anaerobne fermentacije. V drugem delu smo preizkusili biološko predobdelavo LB. Omejili smo se na biološko predobdelavo, saj smo želeli, da je vpliv predobdelave na okolje minimalen in da so stroški povezani z obdelavo stranskih tokov predobdelave minimalni. Predpostavili smo, da lahko povečamo proizvodnjo bioplina z direktnim gojenjem glive *P. ostreatus* na LB. Gliva bele trohnobe *P. ostreatus* je znana kot uspešna proizvajalka celulolitičnih in ligninolitičnih encimov. Predpostavili smo, da lahko glivo *P. ostreatus* uspešno gojimo na trdnem gojišču, prilagojenem rasti in zahtevam glive in pridobimo skupek različnih zunajceličnih encimov, ki jih bomo lahko samostojno uporabili za predobdelavo LB. Za glivo *P. ostreatus* smo se odločili, ker je poznana po tem, da je prilagodljiva in se jo lahko goji na enostaven način.

1.4 Namen in cilji

Namen doktorske disertacije je bila optimizacija in nadgradnja procesa anaerobne fermentacije LB v sistemu šaržnih reaktorjev s strnjenim slojem in križnim pretakanjem izcedne vode. LB vsebuje mnogo kompleksnih spojin, ki jih mikroorganizmi v procesu anaerobne fermentacije niso sposobni razgraditi. Za u inkovitejšo proizvodnjo bioplina je potrebna predobdelava LB v enostavne sladkorje, ki se lahko predelajo v bioplin v procesu anaerobne fermentacije. Nadgradnja procesa anaerobne fermentacije je bila namenjena biološki predobdelavi LB z glivo *P. ostreatus* in encimi proizvedenimi z glivo *P. ostreatus*.

V okviru raziskovalnega dela izvedbe procesa anaerobne fermentacije so bili postavljeni naslednji cilji:

- na laboratorijskem nivoju izvesti poizkus BMP in s tem dolo iti maksimalno proizvodnjo bioplina za obravnavane vzorce LB,
- na laboratorijskem nivoju izvesti poizkus BMP vzorcem preraš enim z glivo *P. ostreatus* in dolo iti vpliv biološke predobdelave z glivo *P. ostreatus* na proizvodnjo bioplina,
- izdelati pilotni sistem za izvajanje procesa anaerobne fermentacije z vsemi potrebnimi merilnimi sistemi za u inkovito študijo poteka procesa anaerobne fermentacije z minimalnimi stroški,
- izvesti anaerobno fermentacijo LB v trdnem stanju s ciljem preverjanja stabilnosti in u inkovitosti anaerobne fermentacije,
- preu iti vpliv pretakanja izcedne vode na stabilnost procesa in na donosnost proizvedenega bioplina.

V okviru raziskovalnega dela, ki se navezuje na biološko predobdelavo LB, so bili postavljeni naslednji cilji:

- vzgojiti glivo *P. ostreatus* na ve razli nih substratih s ciljem poiskati substrat, na katerem bo gliva *P. ostreatus* izlo ila najve zunajceli nih encimov za razgradnjo LB,
- s Taguchi metodo optimizirati sestavo rastnega medija za maksimalno proizvodnjo lakaz glive *P. ostreatus*, saj veljajo lakaze za industrijsko zanimiv encim,
- preveriti u inkovitost razgradnje LB z ekstraktom encimov *P. ostreatus*, ter primerjati u inkovitost z uporabo komercialnih encimov.

Doktorska disertacija je razdeljena na dva glavna dela. Prvi del je namenjen predstavitvi rezultatov izvedbe laboratorijskih in pilotnih poskusov anaerobne fermentacije LB. Drugi del je namenjen predstavitvi rezultatov biološke predobdelave LB, pri emer je predstavljen postopek gojenja glive *P. ostreatus* s katerim smo pridobili encimski ekstrakt, ki smo ga uporabili v poskusu encimske hidrolize LB.

2 Teoretični del

2.1 Lignocelulozna biomasa

Lignocelulozna biomasa (LB) je organski material, ki je na voljo v precejšnjih količinah. Sestavljen je iz surovin, kot so kmetijski ostanki (npr. koruzna stebela, pšeni na slama), gozdarski in lesnopredelovalni ostanki (npr. žagovina, veje, lubje in ostali ostanki, ki nastanejo pri žaganju), organska frakcija trdnih komunalnih odpadkov (npr. odpadni papir, biološki odpadki, obreznine iz vrtov in parkov) in industrijskih organskih odpadkov.

LB se lahko uporablja za trajnostno proizvodnjo bioenergije in biogoriv, kot je bioplin. Anaerobna fermentacija je stroškovno najučinkovitejša tehnologija biološke pretvorbe za proizvodnjo električne energije, toplote in bioplina. Do danes anaerobna fermentacija za izkoriščanje LB ni masovno zastopana za proizvodnjo bioplina, saj kompleksna struktura celi nih sten rastlin predstavlja odporen material za mikrobiološko razgradnjo. LB je v glavnem sestavljena iz treh vrst polimerov: celuloze, hemiceluloze in lignina. Celuloza in hemiceluloza (vsebudeta ogljikove hidrate) sta primerni za fermentacijo po hidrolizi [16].

Na biorazgradljivost LB vpliva vrsta strukturnih in kompozicijskih lastnosti, in sicer kristalinitet celuloze, dostopnost površine, stopnja polimerizacije celuloze, prisotnost lignina in hemiceluloze, stopnja acetilacije hemiceluloze [17]. Za izboljšanje proizvodnje bioplina iz LB je potrebna predobdelava za zrahljanje strukture naravno upornih ogljikovih hidratov – ligninski šit zmanjšuje dostopnost encimov in mikroorganizmov do celuloze in hemiceluloze [18].

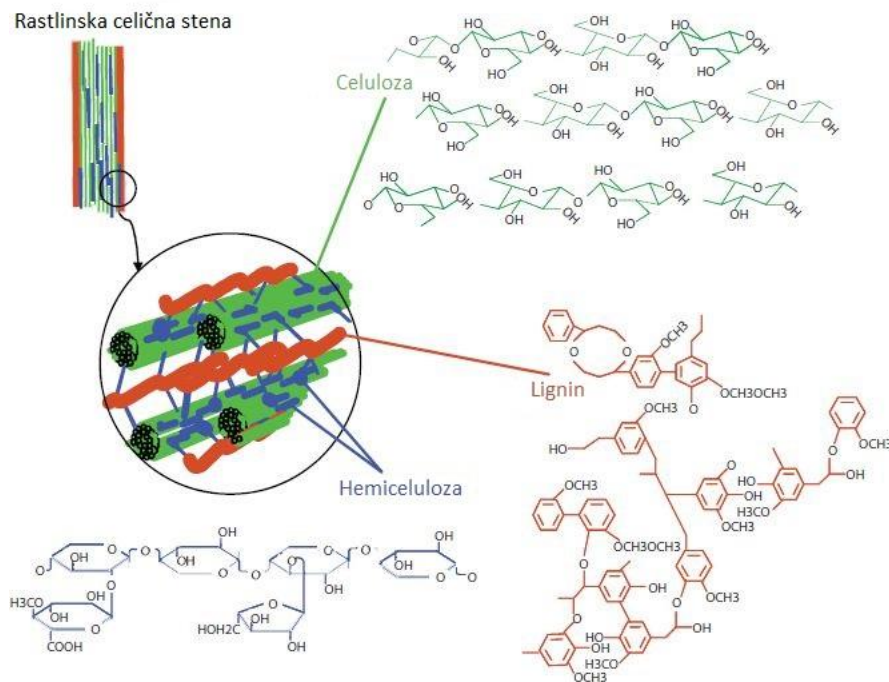
Splošne strukturne značilnosti lignocelulozних materialov se lahko ponazorijo s strukturo lesa. Celi na stena lesa je sestavljena iz primarne in sekundarne stene in srednje lamele. Primarna celi na stena je tanek sloj (0,1 – 1 μm), ki jo sestavlja naključno razporejena matrika celulozних mikrovlaken [19]. Sekundarna celi na stena je debelejša (10 – 20 μm) in je sestavljena iz podslojev S1 (zunanj), S2 in S3 (notranj) z različnimi usmeritvami mikrovlaken za vsak sloj. V S1 sloju so mikrovlakna usmerjena v prečni vija ni strukturi (S in Z vija nica). Najdebelejša med plastmi je S2 plast z relativno usklajenimi usmeritvami mikrovlaken. Sekundarna celi na stena vsebuje večji delež celuloze. Srednja lamela ima funkcijo povezovanja sosednjih celic skupaj in vsebuje velik delež lignina (Slika 2.1) [20].

2.1.1 Sestava in struktura lignocelulozne biomase

Tri glavne komponente celi nih sten rastlin so celuloza, lignin in hemiceluloza (Slika 2.1). Celuloza in hemiceluloza sta polisaharida, medtem ko je lignin aromatski polisaharid sintetiziran iz fenilpropanoidnih predhodnikov [21]. Les, različnih drevesnih vrst, je običajno sestavljen iz 40 do 50 % celuloze, 20 do 35 % hemiceluloze in 15 do 35 % lignina [4]. Podrobnejši podatki sestave različne LB so podani v Tabeli 2.1.

Tabela 2.1: Vsebnost celuloze, hemiceluloze in lignina za različni lesni odpad [9].

LB	celuloza /%	hemiceluloza /%	lignin /%
Debla listavcev	40 – 55	24 – 40	18 – 25
Debla iglavcev	45 – 50	25 – 35	25 – 35
Lušine oreškov	25 – 30	25 – 30	30 – 40
Koruzni storži	45	35	15
Trave	25 – 40	35 – 50	10 – 30
Papir	85 – 99	0	0 – 15
asopisni papir	40 – 55	25 – 40	18 – 30
Pšeni na slama	30	50	15
Listje	15 – 20	80 – 85	0



Slika 2.1: Struktura lignoceluloze [22].

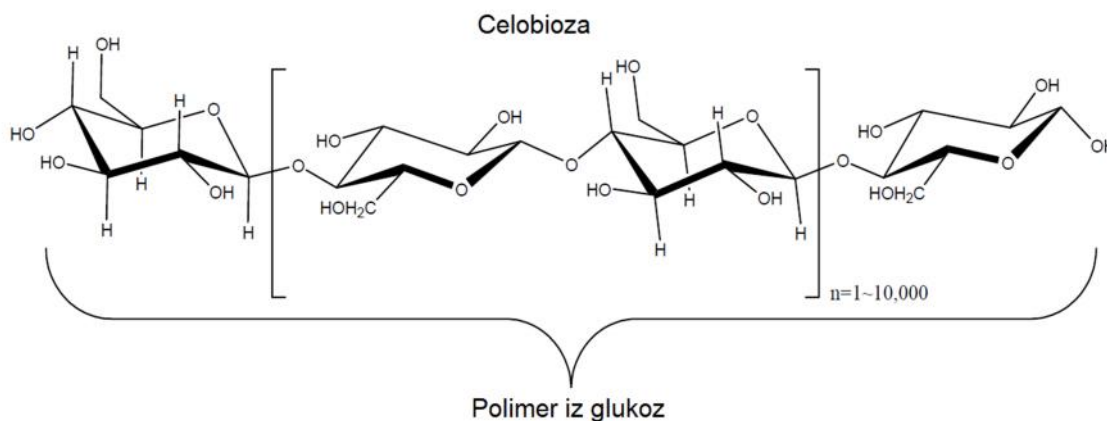
2.1.1.1 Celuloza

Celuloza je organski polisaharid, sestavljen iz linearne verige β -1,4-povezanih D-glukočnih enot. Vsak polimer ima hidroksilni ostanek na C2, C3 in C6 atomih. Glukoze tvorijo dolge verige, ki so med seboj povezane z vodikovimi vezmi in Van der Waalsovimi disperzijskimi silami [8]. Hidroksilni ostanki se vežejo z atomi kisika na drugih sosednjih verigah za tvorbo mikrovlakn. Dolžina celulozne verige lahko variira med 2.000 in 12.000 glukočnih enot, odvisno od izvora, vendar je večina celulozskih molekul dolžine med 8.000 in 12.000 enot glukoze. Vsaka enota glukoze je zasukana za 180° glede na sosednji dve glukočni entit. Tako je najmanjša ponavljajoča enota v polimeru glukoze disaharid celobioza (Slika 2.2) [23].

Celuloza je glavna sestavina lesa, običajno je 40 do 50 % lesne mase sestavljene iz celuloze. Stopnja polimerizacije lesa je nad 10.000. Celuloza se lahko pojavi v dveh oblikah. Približno

50 do 70 % celuloze v oleseni celi ni steni je v visoko obstojni kristalini ni obliki, ostala celuloza je v amorfni obliki [24].

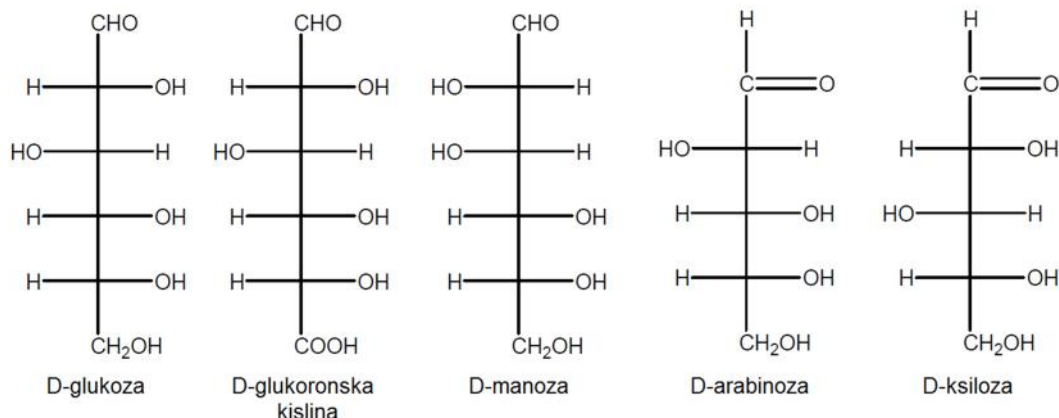
Snopi celuloznih molekul tvorijo skupke in tako formirajo kristalini ne regije z notranjimi molekularnimi vodikovimi vezmi ter izmeni no tudi manj urejene amorfne regije. Najmanjši snop je mikrovlakno. Mikrovlakna gradijo obliko vlaken in vlakna gradijo celulozo. Celuloza ima visoko natezno trdnost in je netopna v ve ini topil, zaradi rednega ponavljanja vodikovih vezi in vlaknaste strukture [21].



Slika 2.2: Kemijska struktura celuloze [25].

2.1.1.2 Hemiceluloza

Hemiceluloza je kompleksen polimer ogljikovih hidratov in sestavlja med 25 ter 30 % suhe teže lesa. Je polisaharid z nižjo molekulsko maso od celuloze. Hemiceluloza je sestavljena iz mnogih razli nih monomernih sladkorjev, kot so: D-ksiloza, L-arabinoza (pentoze), D-manoza, D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnoza (heksoze), 4-O-metil-D-glukuronska kislina, D-glukuronska kislina in D-galakturnska kislina (uronske kisline) (Slika 2.3) [26]. Sladkorji so povezani med seboj z -1,4- in ob asno z -1,3-glikozidnimi vezmi. Glavna komponenta hemiceluloze lesa listavcev je glukonoksilan, medtem ko glukomanan prevladuje v lesu iglavcev. Glavna razlika s celulozo je ta, da ima hemiceluloza razvejane kratke stranske verige, ki so sestavljene iz razli nih sladkorjev. V nasprotju s celulozo, se lahko hemiceluloza zlahka hidrolizira. Ne tvori agregatov, tudi e je so-kristalizirana z verigo celuloze [4]. Povpre na stopnja polimerizacije hemiceluloze se giblje med 70 in 200, odvisno od vrste lesa [27].

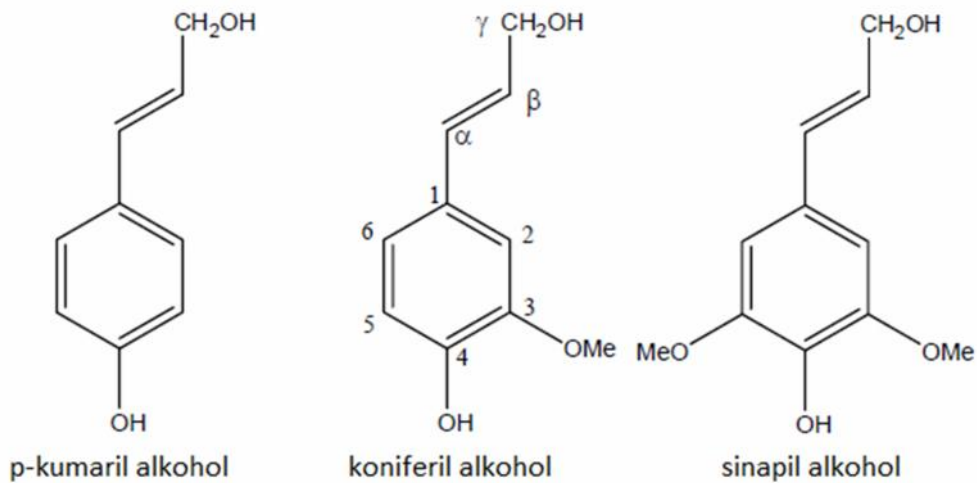


Slika 2.3: Komponente hemiceluloze [25].

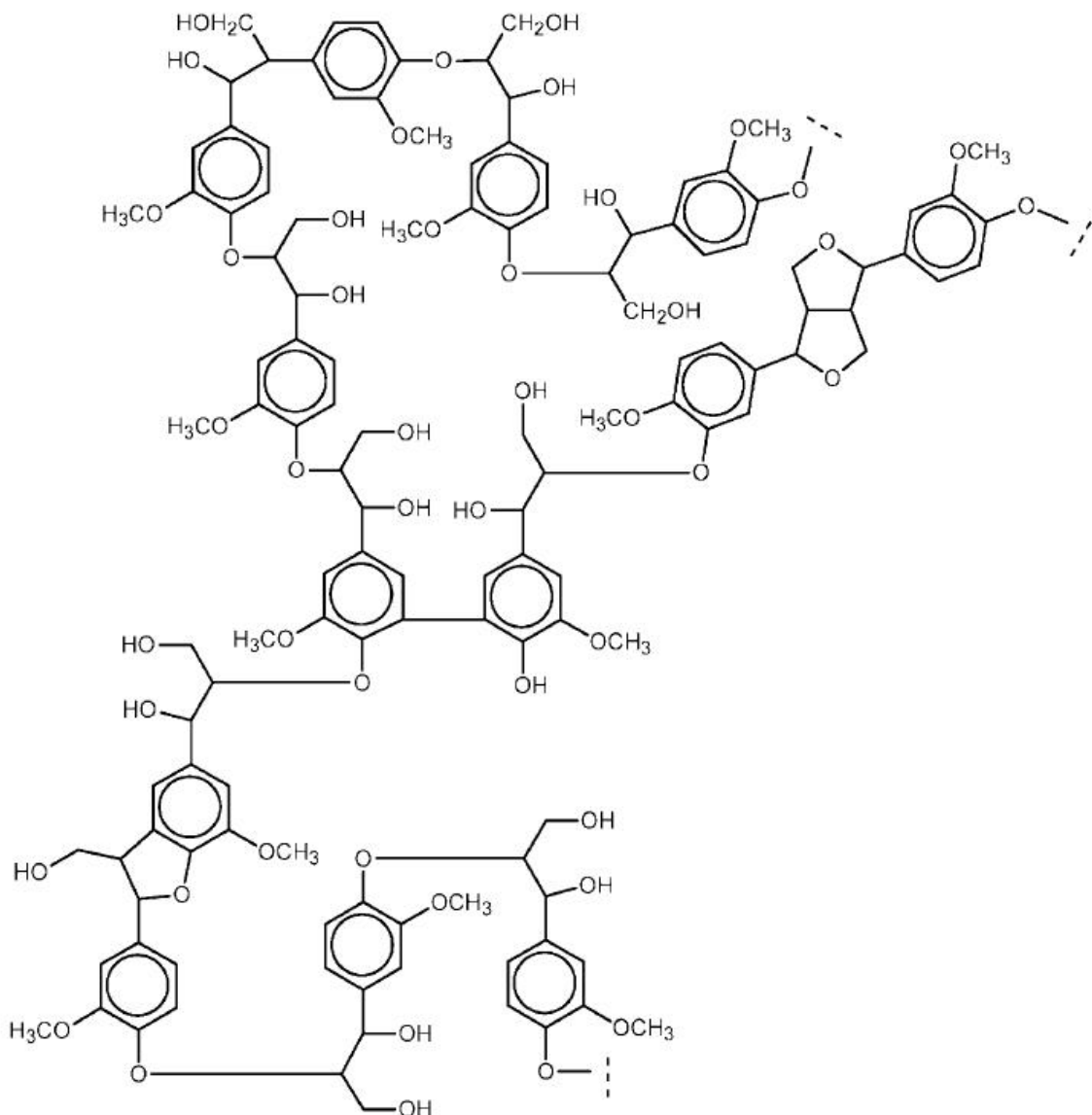
2.1.1.3 Lignin

Lignin (skupaj s celulozo) je najbolj razširjen polimer v naravi. Prisoten je v celi nih stenah in predstavlja strukturno podporo, neprepustnost in odpornost proti mikrobnim okužbam ter proti oksidativnemu stresu. Strukturno je lignin amorfni heteropolimer, ne vodotopen in opti no neaktiven. Sestavljen je iz enot fenilpropana povezanih med seboj z različnimi vrstami povezav. Polimer se sintetizira z nastajanjem prostih radikalov, ki se sprošajo pri peroksidazno posredovani dehidrogenaciji treh fenilpropanskih alkoholov: koniferil alkohol, kumaril alkohol in sinapil alkohol (Slika 2.4). Glavna komponenta lignina v mehkem lesu je koniferil alkohol, medtem ko sta kumaril in sinapil alkohola glavni komponenti lignina v trdem lesu. Končni rezultat polimerizacije je heterogena struktura, katere osnovne enote so povezane s C-C in aril-eter vezavami, pri čemer je glavna struktura aril-glicerol -aril eter (Slika 2.5) [4].

Tako kot pri hemicelulozi, se tudi pri ligninu sestava in količina prisotnega lignina v lesnem materialu spreminja glede na vrsto lesa, tip celic in stopnjo razvitosti vlakna. Lignin predstavlja približno 20 do 35 % lesne strukture [28].



Slika 2.4: Fenilpropanske predhodne enote polimernega lignina [29].



Slika 2.5: Shema sestave lignina golosemenk, ki predstavlja različne vežave med enotami fenilpropana [4].

2.1.2 Predobdelava lignocelulozne biomase

Pri proizvodnji bioplina iz LB so mikroorganizmi sposobni porabiti širok spekter organskih komponent (kot so pentoze, heksoze, mašobne kisline, proteini in mašobe); zato je glavni cilj predobdelave za proizvodnjo bioplina povečanje dostopnosti do holoceluloze v LB. U inkovita obdelava mora povečati poroznost substrata, s tem se poveča dostopnost ogljikovih hidratov za encime. Hkrati je pomembno, da so posamezne frakcije ohranjene brez razgradnje ali izgube organskega materiala. Med predobdelavo se tudi ne smejo tvoriti inhibitorji. Zraven tega mora biti predobdelava ekonomsko upravičena [30]. Mnogo tehnik predobdelav je že bilo obravnavanih v številnih študijah, različne metode so predstavljene v Tabeli 2.2.

Tabela 2.2 Različne tehnike predobdelave.

Tehnika predobdelave	
Fizikalna	mehanska termična ultrazvočna elektrokemična
Kemijska	alkalna kislinska oksidativna
Biološka	mikrobiološka encimska
Kombinirana tehnika	parna eksplozija ekstruzija termokemijska

Glavni cilj predobdelave je priprava biomase za učinkovito izvedbo naslednje stopnje procesa, v katerega je vključena biomasa. Zato je pomembno izbrati tehnologijo, ki izpolnjuje čim več naštetih učinkovitosti:

- povečanje vsebnosti tako C-5 kot C-6 sladkorjev za naslednjo stopnjo fermentacije z minimalno razgradnjo proizvedenih sladkorjev;
- znižanje nastajanja inhibitornih topnih kemikalij vključno s furfuralom, hidroksimetil furfuralom, organske kisline in fenolne spojine, ki so prisotne v fazi encimske hidrolize in fermentacije;
- predobdelava mora biti sposobna upoštevati raznolikost substratov brez obsežnih sprememb v izvedbi procesa;
- zahteva malo ali nič pred procesnih stopenj, kot so zmanjšanje velikosti substrata z drobljenjem, mletjem, upraševanjem, itd.;
- imeti mora visoko stopnjo enostavnosti;
- uporablja nizkocenovne kemikalije z minimalno proizvodnjo odpadnih tokov;
- uporabljati malo energije in stroški opreme in obratovanja morajo biti nizki [31]

2.1.2.1 Biološka predobdelava lignocelulozne biomase

Biološka predobdelava ima nizke energijske potrebe, nezahtevne okoljske pogoje in malo ali nič nastanka inhibitorjev v primerjavi s kemijskimi in fizikalno-kemijskimi tehnikami predobdelave [32]. Vendar predobdelave z glivami zahteva dolge reakcijske čase, zaradi nizke stopnje hidrolize, kar je omejitev pri uporabi v industrijskih procesih, a je okolju prijazna.

2.1.3 Lignocelulozni encimi in njihova vloga pri razgradnji lignoceluloze

Razgradnja LB vključuje več različnih encimov, ki sodelujejo pri hidrolizi biomase. Glede na zapletenost zgradbe LB, pri razgradnji sodelujejo tri ali več različnih skupin encimov, odvisno od konnega produkta, ki ga želimo z razgradnjo doseči in od stopnje zahtevane hidrolize. Glavne tri skupine encimov za razgradnjo LB so ligninaze in celulaze ter hemicelulaze.

2.1.3.1 Celuliti in encimi - celulaze

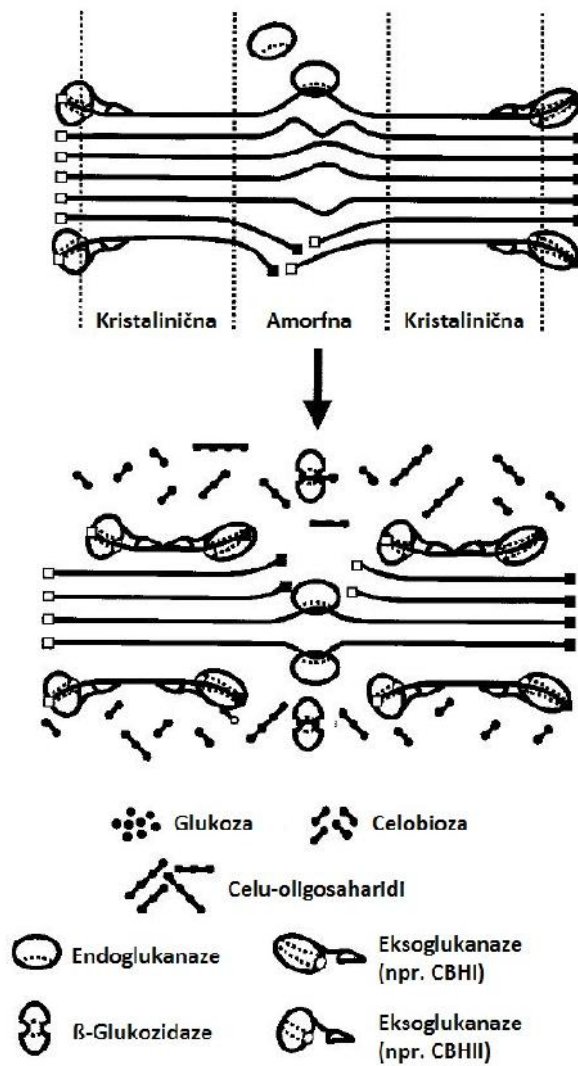
Produkte, pridobljene s hidrolizo lignoceluloznega materiala s celulazami, sestavljajo predvsem glukoza, celobioza in celulozohexosaharidi [33]. Med produkti je glukoza najbolj zaželeno, saj lahko ta osnovna podenota celuloze služi kot dragocena surovina za veliko različnih končnih produktov. Za lažjo hidrolizo celuloze v glukozo sestavljajo sistem celulaz endoglukanaze, eksoglukanaze in α -glukozidaze, ki morajo biti za popolno hidrolizo prisotne v znatnih količinah [34].

Hidroliza celuloze se izvaja s tremi skupinami celulaz, to so endoglukanaze (karboksimetil celulaze; EC 3.2.1.4), eksoglukanaze (celobiohidrolaze; EC 3.2.1.91) in α -glukozidaze (celobiazaze; EC 3.2.1.21).

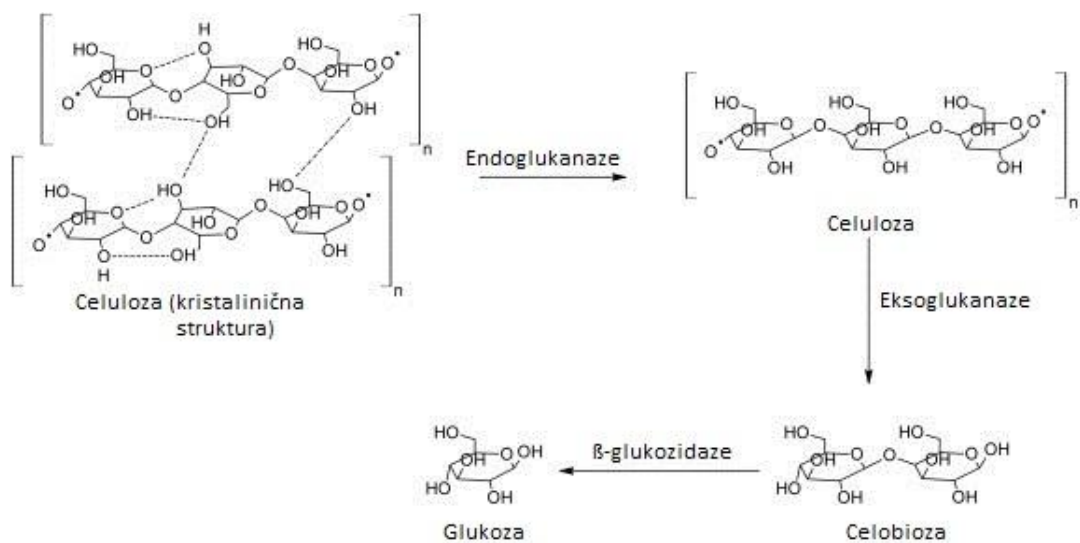
Karboksimetil celulaze naključno hidrolizirajo amorfnost, nabreklo območje verig celuloze, kar ima za rezultat skrajšane verige in po asno naraščajoče število reduciranih skupin. Na splošno so ti encimi neaktivni do kristalini ne celuloze in celobioze s končnimi produkti hidrolize, ki so sestavljeni iz mešanice skrajšanih verig celuloznih vlaken, ki so lahko naknadno razcepljene s celobiohidrolazami [35].

Celobiohidrolaze (CBH), imenovane CBHI in CBHII so zunajceli in encimi, ki cepijo iz obeh koncev celulozne molekule. CBHI deluje na reducirajoče konce celulozne enote, kjer odstranjuje molekule glukoze in celobioze, s čimer se poveča število reduciranih skupin. CBHII deluje na ne-reducirajoče konce ogljikovih hidratov. CBH so edini encimi, ki lahko učinkovito razgradijo kristalini ne dele celuloze, medtem ko lahko endoglukanaze delujejo le na amorfne dele celuloze [4]. Celobiohidrolaze so glavna komponenta celulaznega sistema v glivah, saj predstavljajo med 40 in 70 % vseh proizvedenih celuliti in aktivnosti (Slika 2.6).

α -glukozidaze hidrolizirajo α -1,4 glukozidne vezi celobioze, pri čemer celobioza razpade na glukozne enote. So pomembni encimi v celotni hidrolizi celuloze, saj so celobiohidrolaze inhibirane z visoko koncentracijo celobioze. Zato so eksogene α -glukozidaze potrebne za pretvorbo celobioze v glukozo. Številne različne celulaze so lahko prisotne v posameznem encimskem pripravku, vrsta in količina različnih celulaz je odvisna od njihovega izvora (Slika 2.7) [32]. Celulaze so razvrščene v družine glede na njihovo aminokislinsko zaporedje in/ali glede na podobnosti v njihovih katalitičnih domenah. Aktivno mesto za hidrolizo substrata je vključeno v katalitično domeno, medtem ko domena za vezavo celuloze omogoča vezavo na netopne substrate [36]. Celulaze običajno vsebujejo tri domene, katalitično domeno, domeno za vezavo celuloze in glikoliziran fleksibilen povezovalnik, ki povezuje skupaj ostali dve domeni [37].



Slika 2.6: Shematski prikaz hidrolize amorfne in mikro kristalini ne celuloze z ne kompleksnim sistemom celulaz. Polni kvadrati predstavljajo reducirane konce, prazni kvadrati predstavljajo ne reducirane konce [38].

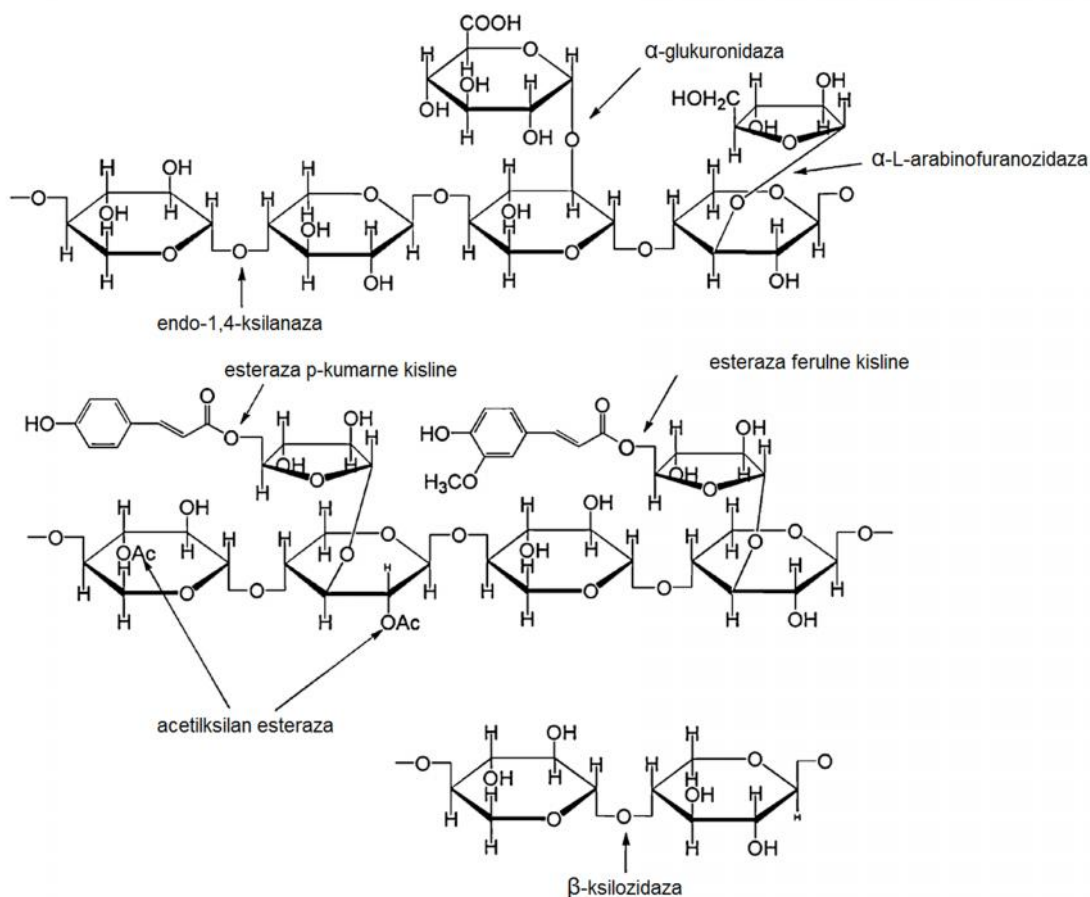


Slika 2.7: Mehanizem hidrolize celuloze s celulazami [39].

2.1.3.2 Hemiceluliti ni encimi

Hemicelulaze so encimi, ki razgrajujejo hemicelulozo, skupino polisaharidov, ki predstavljajo enega od glavnih sestavnih delov celi ne stene rastlin. Hemiceluloza služi za križno medsebojno vezavo celuloznih mikrovlaknen, prav tako pa povezuje molekule celuloze z drugimi komponentami celi ne stene kot je lignin. Ve inoma hemiceluloza vklju uje -glukan (druga en od celuloznega), ksilan, ksiloglukan, arabinoksilan, manan, galakto manan, arabinan, galaktan in poligalakturonan. Glede na specifi ne vezave v hemicelulozi, obstajajo razli ni tipi hemicelulaz [34]. Te encime lahko razvrstimo v dve skupini: hemicelulaze, ki napadejo glavno polisaharidno verigo in tiste, ki razgrajujejo stranske verige.

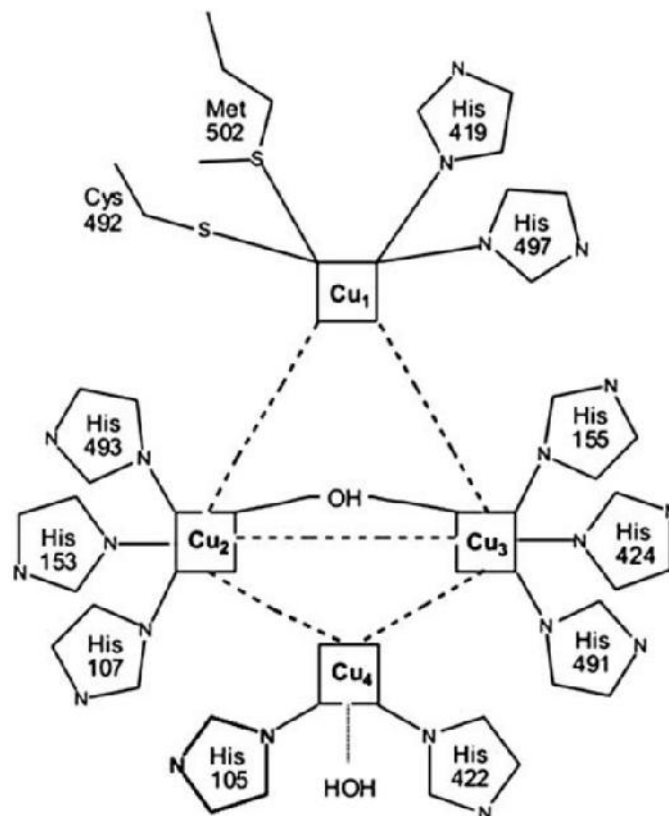
Ksilan, katerega struktura se razlikuje od rastline do rastline, je drugi najpogostejši polisaharid v travah in lesu listavcev in zahteva sodelovanje skupine encimov v njegovi razgradnji. Skupina encimov vklju uje endo- -ksilanaze (EC 3.2.1.8), -ksilosidaze (EC 3.2.1.37), -glukuronidaze (EC 3.2.1.139), -L-arabinofuranosidaze (EC 3.2.1.55) in acetilksilan esteraze (EC 3.1.1.6), ki delujejo sinergijsko v tem procesu (Slika 2.8). Endo-1,4-ksilanaze cepijo notranje -1,4-ksilozidne vezi na glavni polisaharidni verigi ksilana. Za razliko od endoglukanaz, katerih cepilna mesta so naklju na, endo-1,4-ksilanaze prepoznajo specifi ne vezi za vezavo na osnovi lastnosti polisaharida kot sta dolžina verige in stopnja razvejanosti. Produkti razgradnje ksilana z endoksilanazami so mešanica -D-ksilopiranozilnih oligomerov razli nih dolžin, ki so v naslednji stopnji uporabljeni kot substrati -ksiloksidaz, ki hidrolizirajo te oligosaharide do ksiloze iz nereducirnih koncev oligomerov. Zaradi kompleksne strukture polisaharidov hemiceluloze je ve drugih encimov prav tako vklju enih v razgradnjo ksilana [40].



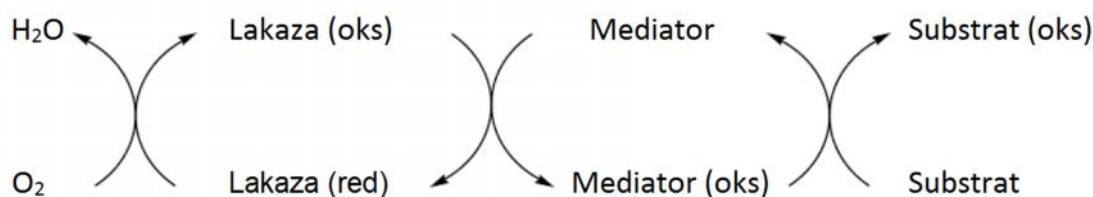
Slika 2.8: Kemi na struktura in razgradnja hemiceluloze [41].

2.1.3.3 Ligninoliti ni encimi

Izjemno zapletena zgradba lignina zahteva vklju itev vrsto oksidativnih encimov za njegovo popolno razgradnjo. Lignin peroksidaze (LiP), mangan peroksidaze (MnP) in lakaze so glavni encimi razgradnje lignina. Zna iltosti teh encimov se mo no razlikujejo glede na vrsto mikrobov. Sposobnost organizma, da proizvede enega ali ve teh encimov, se prav tako mo no razlikuje med razli nimi skupinami organizmov. Zraven LiP, MnP in lakaze so še številni drugi encimi, kot so veratril alkohol oksidaze, aril alkohol dehidrogenaze, kinon oksidoreduktaze, reduktaze aromatske kisline, dioksidgenaze, katalaze, oksidaze aromatskih aldehydov in glioksal oksidaze, vklju eni v zapleten proces razgradnje lignina. Vendar so ti encimi manj pomembni, saj lahko delujejo kot mediatorji pri razgradnji lignina s proizvodnjo H_2O_2 , ki je potreben za aktivnost peroksidaz ali katalizirajo raz lenjene produkte razgradnje lignina, ki jih opravijo encimi kot so LiP, MnP in lakaze [42]. Lakaza je polifenolna oksidaza, ki spada v družino modrih multi bakrovih oksidaz. Ti encimi katalizirajo so asno eno-elektronsko oksidacijo štirih reduciranih molekul substrata s štiri elektronsko redukcijo molekule kisika do vode [43]. Lakaze oksidirajo širok obseg substratov, najboljše fenolne skupine. V prisotnosti mediatorjev, lakaze izkazujejo razširjen obseg substratov z možnostjo oksidacije in tako so s pomo jo mediatorjev lakaze sposobne oksidirati spojine z redoks potencialom, ki presega njihov redoks potencial (Slika 2.10). Lakaze se razlikujejo od LiP in MnP po tem, da ne zahtevajo H_2O_2 za oksidacijo substratov. Aktivno mesto vsake molekule lakaze ima štiri bakrove ione: enega tipa 1, enega tipa 2 in dva tipa 3. Dva bakrova iona na strani tipa 3 sta antifero magnetno povezana. Bakrovi ioni tipa 2 in tipa 3 v aktivnem mestu, so razporejeni v unikaten tri jedrski grozd, ki je sposoben vezave kisika, ki je kon ni prevzemnik elektrona (Slika 2.9). Aktivnost lakaz je široko razširjena med razli nimi skupinami gliv [42].



Slika 2.9: Bakrovi centri v lakazi [44].



Slika 2.10: Katalitski cikel oksidacijskega sistema lakaze – mediator [45].

2.1.4 Višje glive in njihova vloga pri razgradnji lignoceluloze

Obstajata dve glavni skupini gliv razgrajevalk lesa. Prva skupina je Basidiomycotina, obi ajno imenovana prostotrosnice, druga skupina je Ascomycotina ali zaprtotrosnice. Razgradnja lignoceluloze z glivami se v glavnem izvaja s specializirano skupino gliv prostotrosnic (Basidiomycota). Ve ina gliv je sparfotnih (uspevajo na mrtvem organskem materialu in odmrlih organizmih), lahko pa so tudi paraziti, simbioti (mikorzne glive) in patogeni [46]. Glive razkrojevalke lesa razdelimo v tri razli ne skupine, in sicer glive rjave trohnobe, glive bele trohnobe in modrivke. Glive rjave trohnobe razgrajujejo celulozo in hemicelulozo, medtem ko pustijo lignin nerazkrojen. Edina skupina gliv, ki je razvila sistem za u inkovito mineralizacijo lignina, so glive bele trohnobe [47].

2.1.4.1 Glive bele trohnobe

Glive, ki povzro ajo razkroj bele trohnobe izlo ajo encime, ki razgrajujejo predvsem lignin, razgrajujejo pa tudi hemicelulozo in celulozo. Oksidativno razkrojeni lignin daje izgled vlaken belega videza. Po mikroskopskih in ultra strukturnih preiskavah zasledimo dva glavna vzorca razkroja bele trohnobe [48].

Simultana (neselektivna) delignifikacija je zna ilna predvsem za listavce in razgrajuje celulozo, lignin in hemicelulozo so asno. Celi na stena razpade postopno od celi nega lumna proti srednji lameli. Pri tej razgradnji ostajajo znatne koli ine nerazkrojenega lesa. Prostotrosnice (npr. *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Heterobasidion annosum* in *Phlebia radiata*) in zaprtotrosnice (npr. *Xylaria hypoxylon*) povzro ajo to vrsto razgradnje.

Selektivna delignifikacija ali zaporedni razkroj je zna ilna za listavce in iglavce. Za etni razkroj je selektivno usmerjen na razkroj lignina, na hemicelulozo in celulozo pa kasneje. Lignin je razgrajen v srednji lameli, ki je raztopljena z mehanizmom difuzije, in v sekundarni steni. Ta vrsta razkroja poteka izklju no z glivami iz skupine prostotrosnic (npr. *Ganoderma australe*, *Phlebia tremellosa*, *Ceriporiopsis subvermispota*, *Pleurotus* spp. in *Phellinus pini*).

Mnoge glive bele trohnobe povzro ajo obe vrsti trohnobe (neselektivno in selektivno), koli ina simultanega ali selektivnega razkroja lesa se razlikuje tudi med razli nimi sevi iste vrste in je odvisna tudi od substrata [46], [49].

2.1.4.2 Bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*)

Rod *Pleurotus* vklju uje skupine užitnih ligninolitih gliv z zdravilnimi lastnostmi in pomembnimi biotehnološkimi in okoljskimi aplikacijami. Gojenje ostrigarjev je ekonomsko pomembno za živilsko industrijo in se je razširilo v zadnjih 30. letih. *Pleurotus ostreatus* je tretja najpomembnejša gojena goba za prehrabne namene. Glede prehrabnih lastnosti ima edinstven okus in aromatske lastnosti, je bogata s proteini, vlakninami, ogljikovimi hidrati, vitamini in minerali. Vrste *Pleurotus* so obetavne medicinske gobe, ki kažejo hematološke, antivirusne, antitumorne, antibiotske, antibakterijske in hipo holesterolne aktivnosti.

Bioaktivne molekule, izolirane iz razli nih gliv, so predvsem polisaharidi. Eden najpomembnejših vidikov gliv iz rodu *Pleurotus* je povezan z uporabo njihovega ligninolitnega sistema za različne uporabe, kot so biološka pretvorba kmetijskih odpadkov v koristne produkte za krmo živali in drugih prehrabnih izdelkov ter uporaba njihovih ligninolitnih encimov za biorazgradnjo organskih onesnaževalcev, ksenobiotikov in industrijskih kontaminantov [50].

Komercialne gojitvene tehnike za uporabne glive, iz vrst *Pleurotus*, so dobro razvite. V primerjavi z drugimi uporabnimi gobami, so vrste *Pleurotus* relativno enostavne za gojiti. Zraven tega velja rod *Pleurotus* za najbolj prilagodljiv rod uporabnih gob, sposoben rasti na raznolikih lignoceluloznih materialih [51]. Gojenje ostrigarjev se pojavlja po vsem svetu z uporabo številnih substratov. Vrsta uporabljenega substrata je pogosto odvisna od razpoložljivosti materialov v določeni regiji. V naravi rastejo vrste *Pleurotus* na lesu listavcev, zato so lesni ostanki primerni substrati za gojenje ostrigarjev. Pšenična slama je najbolj ustrezen substrat za gojenje ostrigarjev v ZDA in EU, medtem ko je obilica riževe slame na voljo na Kitajskem in se tam izkorišča kot substrat za gojenje ostrigarjev [52]. Zraven teh se kot substrati za gojenje ostrigarjev uporabljajo tudi koruzni storži, riževi in pšenični otrobi, žagovina, ostanki iz cvetličarstva, oljarski odpadki in ostanki iz pivovarstva [53] – [57].

Vrste gliv iz rodu *Pleurotus* proizvajajo različne encime, ki vključujejo hidrolaze, peroksidaze in fenoloksidaze. Glede na širok spekter proizvodnje encimov, bi se lahko povečalo gojenje gliv vrste *Pleurotus* za proizvodnjo določene encimov ali encimskih mešanic z aplikacijami na različnih področjih, kot so področja prehrane, bioremediacije in razgradnja lesnih ostankov. Vrste *Pleurotus* so uporabne glive in glede na to imajo velike prednosti pred neuporabnimi glivami npr. iz vrst *Aspergillus* in *Penicillium*.

2.2 Anaerobna fermentacija za proizvodnjo metana

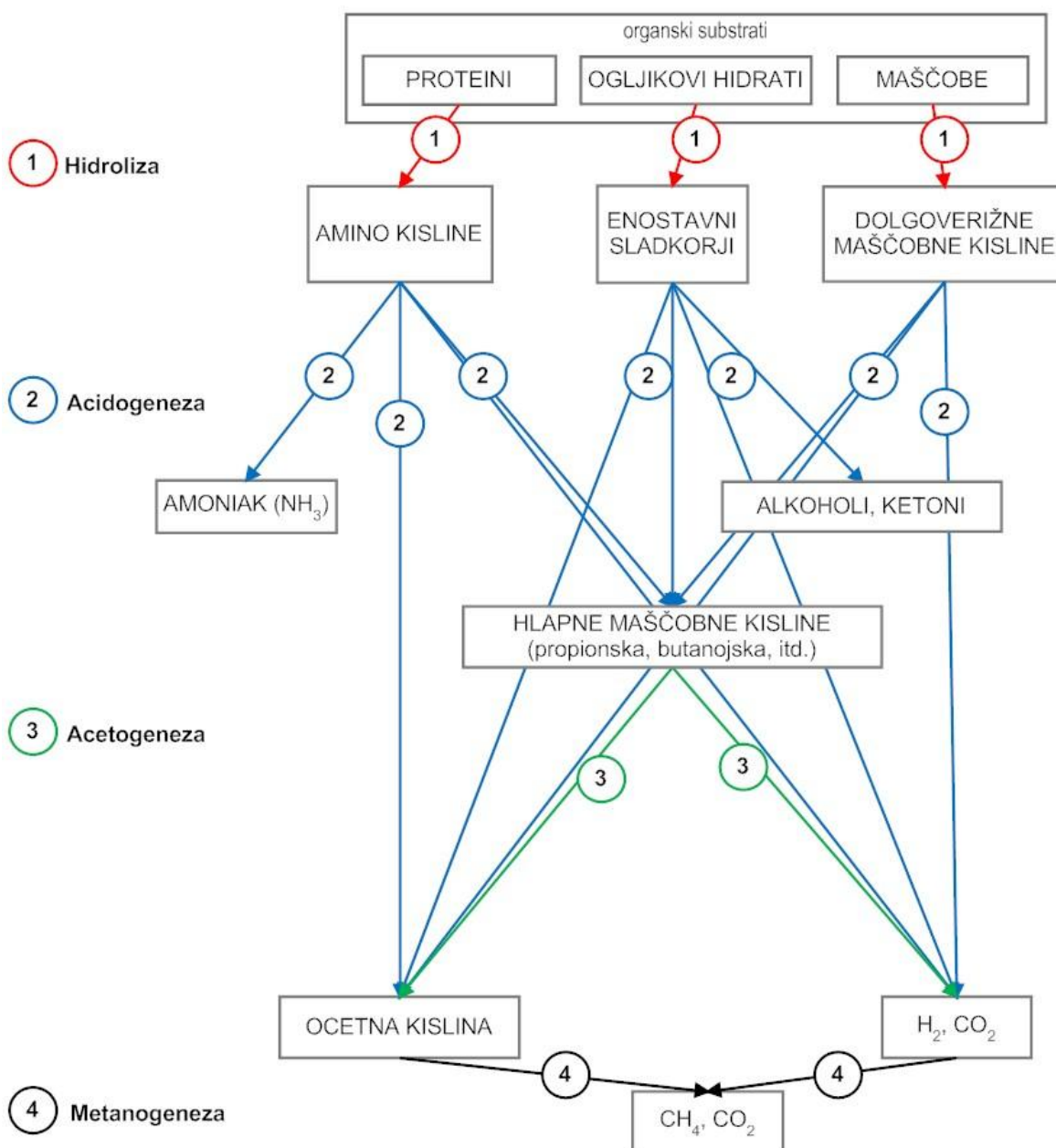
Anaerobna razgradnja je proces, pri katerem kompleksna mešanica simbiotskih mikroorganizmov pretvori organske snovi, brez prisotnosti kisika, v bioplin, hranila in dodatni organski material. Ostanke pa soli in nerazgrajeni organski material. Bioplin je običajno sestavljen iz metana (CH₄; 55 – 75 %) in ogljikovega dioksida (CO₂; 25 – 45 %), vodne pare in sledi vodikovega sulfida. Bioplin je brez vonja in brez barve, ki gori z modrim plamenom. Proces anaerobne razgradnje izvajajo mikroorganizmi pri strogo anaerobnih pogojih iz dveh bioloških kraljestev, to so bakterije in arheje [58], [59].

Z anaerobno fermentacijo se stabilizira organska snov v blatih odpadnih vod, zmanjšajo se patogeni, smrad in celokupna trdna snov s pretvorbo njenega dela v bioplin. Različni faktorji, kot so bioplinski potencial substrata, na rtovanje reaktorjev, inokulum, strukturne značilnosti substrata, pH, temperatura, stopnja obremenitve, zadrževalni čas, razmerje med ogljikom in dušikom, hlapne mašobne kisline, itd., vplivajo na proizvodnjo bioplina. Anaerobna fermentacija se lahko izvaja tako v šaržnih reaktorjih, kot tudi kontinuirnih reaktorjih. Obravnava se kot tehnologija za obdelavo odpadkov s katero se izboljšuje kakovost okolja in kot tehnologija trajnostnega pridobivanja energije [3].

Anaerobna fermentacija je dobro uveljavljen biološki proces za proizvodnjo obnovljive energije, pri katerem biomasa (substrat) razpade in se pretvori v bioplin. Za proces anaerobne fermentacije se uporablja širok spekter različnih substratov (industrijske in komunalne odpadne vode in blata, organska frakcija komunalnih odpadkov, gnojevka), zlasti iz živilsko – predelovalne industrije, ki vsebujejo visoke koncentracije lahko razgradljivih organskih snovi v obliki ogljikovih hidratov, proteinov in mašob. V zadnjem obdobju se

pojavlja vse ve zanimanja za proizvodnjo biometana iz lignocelulozne biomase, ki predstavlja trajnostni vir substrata, katerega je relativno dovolj na razpolago in je cenovno dostopen.

Pri procesu anaerobne fermentacije lo imo štiri glavne korake in sicer: hidrolizo, acidogenezo, acetogenezo in metanogenezo in štiri glavne skupine mikroorganizmov: hidroliti ne – fermentacijske bakterije, ki hidrolizirajo kompleksne organske spojine v enostavne spojine; fermentacijske bakterije, ki pretvarjajo preproste organske spojine v hlapne maš obne kisline s hkratno proizvodnjo vodika (H_2) in ogljikovega dioksida (CO_2); acetogene bakterije, ki pretvarjajo hlapne maš obne kisline v očetno kislino in zadnja skupina so metanogene bakterije, ki proizvajajo metan iz acetata ali iz H_2 in CO_2 [60]. Potek anaerobne fermentacije je predstavljen na Sliki 2.11.



Slika 2.11: Potek anaerobne fermentacije (hidroliza, acidogeneza, acetogeneza in metanogeneza).

2.2.1 Potek anaerobne fermentacije

2.2.1.1 Hidroliza

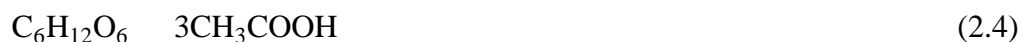
Prva faza je depolimerizacija organskega materiala. Med hidrolizo so kompleksne netopne snovi, kot so polisaharidi, hidrolizirajo v manjše enote z velikim številom hidroliti nih mikroorganizmov (*Klostridia*, *Mikrokoki*, *Bakteroidi*, *Selenomomasi*, *Streptokoki*), ki izlo ajo razli ne hidroliti ne encime, kot so: celulaze, celobiaze, ksilanaze, amilaze, proteaze, lipaze [61], [62]. Hidrolitske reakcije zajemajo dve fazi, ki jih izzovejo ekstracelularni encimi bakterij, ki so striktni ali fakultativni anaerobi. V prvi fazi poteka bakterijska kolonizacija, kjer hidrogene bakterije prekrijejo površino trdnih delcev. Bakterije na površini delcev izlo ijo encime, ki razgradijo kompleksne substrate do monomerov, ki jih lahko porabijo hidroliti ne bakterije same ali druge bakterije [63].



Približna kemijska formula za mešane organske odpadke je $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$. Ena ba 2.1 prikazuje primer hidrolitske reakcije, kjer so organski odpadki razgrajeni v preproste sladkorje, kot je glukoza. S hidrolizo celuloze z encimskim kompleksom celulaz nastane glukoza, z razgradnjo hemiceluloze nastanejo monosaharidi, kot so ksiloza, glukoza, galaktoza, arabinoza in manoza. Anaerobna fermentacija trdnih lignoceluloznih materialov in dostopnost hidroliti nih mikroorganizmov do lignoceluloze predstavljajo korak, ki omejuje hitrost procesa. Ena od možnosti je predobdelava LB, s katero se razgradijo polimeri, ki prepre ujejo prodiranje mikroorganizmov ali ekstracelularnih encimov [62], [64], [65].

2.2.1.2 Acidogeneza

Hidroliti ni in acidogeni mikroorganizmi rastejo približno desetkrat hitreje kot metanogeni. V acidogenezi se navadno odvijajo najhitrejše reakcije pri anaerobni konverziji kompleksnega organskega materiala [66]. Med acidogenezo sladkorjev, dolgoverižnih maš obnih kislin in amino kislin, ki so produkti hidrolize, so uporabljeni kot substrati fermentacijskih mikroorganizmov (*Streptokoki*, *Laktobacili*, *Bacili*, *Escherichia coli*, *Salmonela*), ki proizvajajo organske kisline, kot so očetna, propionska, maslena in ostale kratko verižne maš obne kisline, alkohole, H_2 in CO_2 [67] – [69].

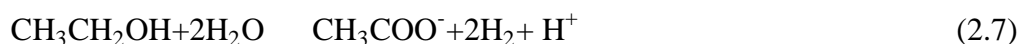
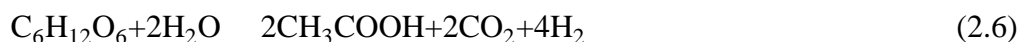
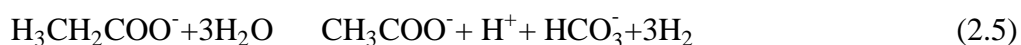


Ena be 2.2 do 2.4 predstavljajo tri tipi ne reakcije acidogeneze. Ena ba 2.2 prikazuje pretvorbo glukoze v etanol. V Ena bi 2.3 je prikazana pretvorba glukoze v propionat in Ena ba 2.4 prikazuje pretvorbo glukoze v očetno kislino. Prehod organskega materiala v organske kisline povzro i znižanje pH vrednosti v sistemu. Ti pogoji so koristni za acidogene in acetogene bakterije, ki imajo raje nekoliko bolj kislo okolje s pH vrednostmi med 4,5 in 5,5. Ve ina produktov, proizvedenih v metabolizmu glukoze, ima kot intermediat piruvi no kislino. V odvisnosti od prisotne anaerobne mikrobne združbe in od lastnosti reaktorja, lahko vodi nadaljnja fermentacija piruvi ne kisline v proizvodnjo številnih $\text{C}_1 - \text{C}_4$ spojin kot so hlapne maš obne kisline npr. očetna, propionska in maslena kislina, ostale organske kisline (mravljin na in mle na), alkohole, ketone in aldehide [70]. Amino kisline lahko služijo tudi kot energija in vir ogljika za striktno ali fakultativne fermentacijske bakterije. Kratko verižne maš obne kisline ($\text{C}_2 - \text{C}_5$, ravne ali razvejane) nastajajo s pomo jo reduktivne deaminacije alifatskih amino kislin, specifi ne fermentacijske poti individualnih

amino kislin ali oksidacijsko – redukcijskih reakcij med pari amino kislin [71], [72]. Koncentracija in delež posamezne hlapne maš obne kisline, proizvedene v acidogeni fazi, je pomemben za splošno u inkovitost sistema anaerobne fermentacije, saj sta očetna in maslena kislina pomembna predhodnika za tvorbo metana [73].

2.2.1.3 Acetogeneza

Acetogene bakterije so striktni anaerobi, ki delujejo optimalno pri pH vrednosti okrog 6 in u inkujejo po vzorcu poti acetil koencima A, ki vsebuje encime ekstremno občutljive na kisik [74]. So po asi rasto e, občutljive na nihanja v organski obremenitvi in spremembah okolja. Zahtevajo dolgo fazo prilagajanja na nove pogoje okolja [75]. Metanogeni mikroorganizmi ne morejo neposredno uporabiti produktov acidogeneze, zato morajo biti nadalje pretvorjeni med acetogeno fazo, preden iz njih nastane bioplin. Med acetogenezo poteka pretvorba produktov iz acidogeneze v očetno kislino, vodik in ogljikov dioksid s pomo jo sekundarnih fermentacijskih bakterij. Na splošno lahko lo imo dve vrsti acetogenih mehanizmov (hidrogenacijo in dehidrogenacijo). Acetogeni hidrogenacijski mikroorganizmi vklju ujejo proizvodnjo acetata kot edinega kon nega produkta, bodisi s fermentacijo heksoz ali iz CO₂ in H₂. Acetogeni dehidrogenacijski mikroorganizmi vklju ujejo anaerobno oksidacijo dolgoverižnih in kratkoverižnih (hlapnih) maš obnih kislin. Sodelujejo i mikroorganizmi so obligatorne proton reducirajo e ali obligatorne vodik proizvajajo e bakterije. Te bakterije inhibirajo nizki parcialni tlaki vodika, tako da lahko preživijo le v sinergiji z vodik porabljaajo i metanogeni mikroorganizmi. Očetna kislina, vodik in ogljikov dioksid, proizvedeni med acidogenezo in acetogenezo, so substrati za metanogeno fazo [69], [76], [77].



Ena na 2.5 predstavlja pretvorbo propionata v acetat, kar je dosegljivo samo pri nizkem tlaku vodika. V Ena bi 2.6 je glukoza pretvorjena v acetat. Acetogeni mikroorganizmi ne morejo pretvoriti etanola direktno v metan in ogljikov dioksid. Najprej morajo pretvoriti etanol do očetne kisline in posledni no sprostijo molekularni vodik. Ena ba 2.7 prikazuje pretvorbo etanola do acetata [3].

2.2.1.4 Metanogeneza

Metan je stranski produkt metabolizma metanogenih mikroorganizmov, ki pripadajo Arhejam, pri anaerobnih pogojih. Metanogeni imajo nenavaden tip metabolizma, saj uporabljajo H₂/CO₂, format, metilirane C1 spojine ali acetat kot vir energije in vir ogljika za rast. Proizvodnja metana se pojavi v dveh na inih: s pomo jo cepitve molekul očetne kisline do ogljikovega dioksida in metana ali z redukcijo ogljikovega dioksida z vodikom.



Hidrogenotropna metanogeneza je najpogostejša metabolna pot, kjer se CO₂ in H₂ pretvorita v metan (Ena ba 2.8). Zraven H₂ lahko ve ina hidrogenotropov, kot glavni donor elektronov, uporabi tudi format [78]. V drugem tipu metanogeneze (acetoklastna metanogeneza) je acetat direktno pretvorjen v metan (Ena ba 2.9). Karboksilna skupina acetata je oksidirana v CO₂, pri emer je metilna skupina reducirana do metana. Metanogeni, ki porabljaajo vodik, so

bolj odporni na spremembe okolja kot acetoklastni metanogeni. Metanogeni so na splošno zelo občutljivi na spremembe, ljubše jim je rahlo alkalno okolje. Če pade pH vrednost v sistemu pod 6, metanogeni ne morejo preživeti. Metanogeneza je stopnja, ki kontrolira celoten anaerobni proces [69],[79].

Čeprav se ocenjuje, da proces anaerobne fermentacije poteka v štirih fazah, se pojavljajo vse štiri faze sočasno in tako sinergijsko delujejo na proces kot celoto.

2.2.2 Dejavniki, ki vplivajo na proces anaerobne fermentacije

Celoten proces anaerobne fermentacije zahteva kompleksne interakcije več različnih vrst bakterij, ki morajo biti v ravnotežju, da ostanejo razmere v reaktorju stabilne. Spremembe pogojev okolja lahko motijo ravnotežje in povzročijo kopičenje vmesnih produktov, ki lahko zavrejo celoten proces ali ga v celoti destabilizirajo. Kljub negatiwnemu pomenu za stabilen proces je uporaba merilnih in senzorskih naprav za kontinuirano spremljanje parametrov v reaktorju, s katerimi lahko preprečimo nestabilnost procesa.

Vse dejavnike v reaktorju vpliva na okolje v reaktorju in s tem na stopnjo razgradnje in proizvodnjo bioplina. Med potekom procesa je potrebno spremljati vrsto v nadaljevanju navedenih parametrov, katerih vrednosti je potrebno vzdrževati znotraj sprejemljivih vrednosti za omogočanje stabilnosti procesa.

2.2.2.1 pH vrednost

Primarni pogoj stabilnosti procesa v fermentorju je vrednost pH, ki se lahko spremeni glede na odziv na biološke pretvorbe med različnimi fazami v procesu anaerobne fermentacije. Stabilna pH vrednost nakazuje ravnotežje v fermentorju in stabilnost procesa. Znižanje vrednosti pH lahko kaže akumulacijo kislin in nestabilnost fermentorja. Razpon sprejemljivih pH vrednosti za bakterije, ki sodelujejo v procesu anaerobne fermentacije, je med 5,5 in 8,5, čeprav velja, da bližje je vrednost pH nevtralnemu območju, večja je verjetnost optimalnega delovanja metanogenih bakterij [80]. Medtem ko lahko acidogene bakterije delujejo dobro pri pH vrednostih nad 5, metanogene bakterije zahtevajo minimalno pH vrednost 6,2.

Med fermentacijo acidogena faza in metanogena faza zahtevata različne pH vrednosti za optimalen potek procesa. Acetogeneza lahko povzroči kopičenje velikih količin organskih kislin, s tem se lahko pH vrednost v fermentorju zniža pod pH 5. V začetni fazi se pH zniža, ko so organske snovi izpostavljene acetogenezi. Vendar metanogeni hitro porabijo te kisline in zvišajo pH vrednost fermentacijske brozge in stabilizirajo delovanje fermentorja. Zaradi občutljivosti metanogenov na kisle pogoje, lahko prekomeren nastanek kislin zavira metanogene. Največja verjetnost za nestabilnost procesa v fermentorju je posledica akumulacije kislin. Znižanje pH lahko kontroliramo s pomočjo dodajanja apna ali s pretakanjem izcedne vode iz obdelave ostanka po fermentaciji [81].

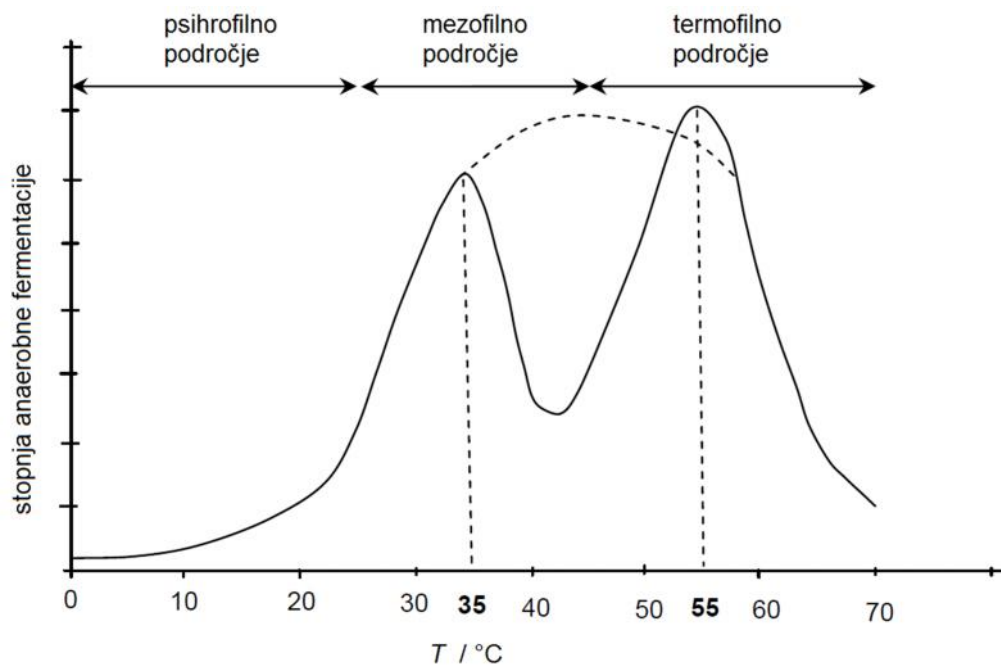
2.2.2.2 Temperatura

Zaradi močne odvisnosti temperature in stopnje razgradljivosti, je temperatura eden od ključnih parametrov, ki ohranja sistem v zelenem območju. Anaerobne bakterije lahko preživijo v območjih od temperatur blizu ledišča pa do 70 °C, vendar optimalno rastejo v dveh območjih: mezofilnem z optimalno temperaturo okrog 35 °C, in termofilnem, z optimalno temperaturo 55 °C.

Termofilni temperaturni nivo omogoča višje stopnje obremenitve in dosega višjo stopnjo uničenja patogenih organizmov. Višja je tudi stopnja degradacije substratov. Vendar je ta temperaturni nivo bolj občutljiv na toksine in manjše spremembe okolja, prav tako je manj ugoden nivo iz energijskega vidika, saj potrebuje več toplote. Bakterije, ki delujejo v

mezofilnem območju, so bolj robustne in lahko prenesejo več spremembe okoljskih parametrov, vključno s temperaturo [82], [83].

Če je na voljo dovolj asa za prilagajanje mikroorganizmov v šaržnem ali kontinuirnem reaktorju, je gojenje mikroorganizmov možno tudi pri temperaturah 30, 37, 45, 50 in 55 °C. Pri takih pogojih bo proizvodnja bioplina na podobni ravni (preravnana krivulja na Sliki 2.12) kot je pri mezofilnem ali termofilnem območju (Slika 2.12) [82].



Slika 2.12: Vpliv temperature na stopnjo procesa anaerobne fermentacije. Preravnana krivulja predstavlja potek anaerobne fermentacije pri vmesnih temperaturah med mezofilnim in termofilnim območjem [82].

2.2.2.3 Razmerje ogljik/dušik

Razmerje ogljik/dušik je merilo relativne količine organskega ogljika in dušika prisotnega v vhodnem substratu anaerobne fermentacije. Optimalno razmerje C/N v anaerobnih fermentorjih je med 20 in 30. Nizko razmerje C/N ali preveč dušika lahko povzroči kopičenje amonijaka, ki lahko privede do pH vrednosti nad 8,5, ki so toksični za metanogene bakterije. Visoko razmerje C/N bo povzročilo hitro potrošnjo dušika iz strani metanogenih bakterij, kar se odraža z nižjo stopnjo proizvodnje plina. Optimalno C/N razmerje anaerobno fermentiranih substratov se lahko doseže z mešanjem substratov z nizkim in visokim C/N razmerjem. Tak primer je mešanje organske frakcije komunalnih odpadkov z živalsko gnojevko ali komunalnimi odplakami [81].

2.2.2.4 Zadrževalni čas

Časovno obdobje, v katerem ostane substrat v reaktorju, se imenuje zadrževalni čas. Določimo ga glede na povprečni čas, ki je potreben za razkroj organskega materiala in je merjen kot KPK in BPK v izhodnem toku iz reaktorja. Daljši čas kot je substrat izpostavljen pogojem anaerobnih reakcij, bolj popolna je razgradnja substrata. Kakorkoli, intenzivnost reakcij v reaktorju se bo zmanjšala s podaljševanjem zadrževalnega časa, kar kaže na to, da je potrebno določiti optimalni čas, v katerem bo dosežena visoka stopnja razgradnje na stroškovno učinkovito in. Primeren zadrževalni čas je odvisen od vhodnih surovin, razmer okolja in predvideno uporabo trdnega ostanka po fermentaciji [84]. Ena od slabosti anaerobne fermentacije v trdnem stanju je dolg zadrževalni čas (15 do 30 dni), v primerjavi s

teko o fermentacijo, kjer so lahko zadrževalni asi nižji od treh dni. Substrati z visoko vsebnostjo organske snovi potrebujejo daljši zadrževalni as za razgradnjo. Vendar se lahko zadrževalni as fermentacije v trdnem stanju zniža z obratovanjem sistema v termofilnem temperaturnem področju [85].

2.2.2.5 *Organska obremenitev*

Organska stopnja obremenitve je opredeljena kot količina organskih snovi (izraženo kot hlapne trdne snovi ali KPK vhodnega substrata), ki mora biti obdelana v določenem volumnu reaktorja in v določenem časovnem obdobju. Organska stopnja obremenitve lahko variira pri istem zadrževalnem času substrata, če količina organske snovi v vhodnem substratu variira. Nevarnost povečanja organske stopnje obremenitve se lahko kaže v povečanem številu acidogenih bakterij, ki delujejo v začetni fazi procesa razgradnje in se hitro razmnožujejo. To privede do večjih količin in proizvedenih kislin, ki jih metanogene bakterije ne morejo prebaviti v tako veliki količini, saj se razmnožujejo počasneje in v začetni fazi njihova populacija še ni dovolj razmnožena. Tako lahko vrednost pH v sistemu pade, kar lahko privede do nestabilnosti v sistemu in posledično do ustavitve razgradnje. Zgodnja znaka, ki nakazujejo nestabilnost, sta nizka proizvodnja bioplina in nizka vrednost pH [86].

2.2.2.6 *Hranila*

Za stabilno fermentacijo in optimizacijo biometanizacije mora biti poleg ostalih pogojev zagotovljeno tudi primerno ravnotežje sestave hranil in mineralov v substratu. Glavna hranila: ogljikove, dušikove, fosforjeve in žveplove spojine morajo biti na razpolago za rast celične biomase. Pomanjkanje hranil ali neprimerno ravnotežje hranil lahko precej zavira tvorbo metana oz. moti fermentacijo in zmanjša proizvodnjo metana [87]. Elementi v sledovih so nujni za rast in metabolizem mikroorganizmov: žveplo je potrebno za graditev celične strukture in za metanogene bakterije so nujno potrebni nikelj, kobalt, molibden in volfram [88].

2.2.2.7 *Mešanje*

Mešanje je običajno potrebno za optimizacijo procesa, za izboljšavo kontakta med materialom in mikroorganizmi in za odstranitev inhibitornih metabolnih produktov od mikroorganizmov. Mešanje se prav tako uporablja za razprševanje plavajočih in slojev penjenja, ki so značilni za nekatere vhodne snovi, kot so gospodinjski mulji. Zaradi tega komercialni fermentorji vključujejo mešanje, ki se opravlja z mehničnim premikanjem, obtakanjem tekočine ali obtakanjem plina. Pri šaržnih reaktorjih se ne mešajo trdne snovi v reaktorju, ampak se uporabi izcedna voda za uravnavanje vlage, inokulacijo in odstranitev inhibitornih organskih kislin, ki se tvorijo v začetni fazi [89].

2.3 Osnovni koncept načrtovanja eksperimentov

Statistično načrtovanje eksperimentov se nanaša na postopek načrtovanja eksperimentov. Tako se lahko ustrezni podatki analizirajo s statističnimi metodami, ki izhajajo iz veljavnih in objektivnih zaključkov [90]. Pri obravnavi eksperimentalnih podatkov lahko obstajajo težave zaradi eksperimentalnih napak. Edini način, da se lahko izognemo eksperimentalnim napakam, je statistična metodologija. Pomembna je jasna ideja pred izvedbo dejanskih eksperimentov. Slika 2.13 prikazuje smernice za načrtovanje eksperimentov po predlogu Montgomery [90]. Tudi če so podatki zbrani na ustrezen način, je analiza odvisna od celotnih izvedenih eksperimentov. Brez ustreznega načrtovanja eksperimentov je težko

izvesti jasno in natančno analizo. Pri načrtovanju eksperimentov je zelo pomembno, da zelo dobro razumemo njegovo strukturo in sestavine. Nivo vsakega faktorja mora biti obravnavan glede na praktična izkušnja in teoretična znanja.



Slika 2.13: Smernice eksperimentalnega načrtovanja (povzeto po Montgomery [90]).

2.3.1 Načrtovanje eksperimenta s Taguchi metodo

Taguchi metoda vključuje zmanjšanje variacij v procesu z zanesljivim načrtovanjem eksperimenta. Eksperimentalno načrtovanje s Taguchi metodo vključuje uporabo ortogonalnih matrik z namenom organiziranja parametrov, ki vplivajo na proces, in nivojev na katerih lahko parametri variirajo. Metoda omogoča zbiranje potrebnih podatkov za določitev faktorjev, ki najbolj vplivajo na produktivnost procesa z minimalnim številom eksperimentov, s čimer prihranimo čas in vire. Analiza nihanja zbranih podatkov po Taguchi metodi se lahko uporablja za izbiro novih vrednosti parametrov z namenom optimizacije procesa [91]. Obstajata dve vrsti faktorjev, ki vplivata na proizvod ali proces. Prvi so kontrolni faktorji in drugi so faktorji šuma. Kontrolni faktorji (npr. temperatura procesa) se lahko nadzorujejo, medtem ko je faktorje šuma (npr. zunanja temperatura) težko nadzirati ali se ne morejo nadzirati. Analiza razmerja med signalom in šumom je tako med prednostmi nastavitvev. Obstajajo tri različne kategorije karakteristik analize razmerja med signalom in šumom [90]:

- (a) Manjše je boljše (omogoča odziv sistema na najnižjo vrednost):

$$-10\log \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2 \right] \quad (2.10)$$

- (b) Nominalna vrednost je najboljša (zmanjšanje variabilnosti okrog ciljne vrednosti):

$$10\log \left[\frac{\bar{y}^2}{s^2} \right] \quad (2.11)$$

- (c) Ve je je boljše (omogoča odziv sistema na najvišjo vrednost):

$$-10\log \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right] \quad (2.12)$$

kjer so:

- \bar{y} povpre je opazovanih podatkov,
 s odmik od y ,
 n število ponovitev eksperimentov,
 y opazovani podatek.

3 Eksperimentalni del

3.1 Materiali

3.1.1 Lignocelulozna biomasa

Lignocelulozno biomaso (LB) smo pridobili iz Centra za ravnanje z odpadki CERO Gajke Ptuj. Veji del LB je sestavljen iz lesne biomase, ki vsebuje obreznine dreves in grmovja, poleg tega velik del LB vsebuje tudi pokošeno travo, obreznine živih mej, ostanke okrasnih rastlin, plevel in listje. Razmerje posamezne komponente v LB ni konstantno skozi celotno leto, močno je odvisno od letnega obdobja. Posamezni vzorec LB smo zmleli z vrtnim drobilnikom Viking GE 250. Tako pripravljeno LB smo uporabili v pilotnem procesu anaerobne fermentacije. Sledilo je fino mletje LB s sekljalnikom Philips Blender HR 2161/40. Tako pripravljeno LB smo uporabili v sistemu AMPTS II. Za pripravo gojišča za gojenje glive *P. ostreatus*, smo fino mleto LB sušili pri temperaturi 60 °C, nato smo jo zdrobili na delce 0,2 do 0,5 cm s sekljalnikom Moulinex AR 1105. Tako pripravljeno LB smo uporabili tudi pri testu encimske hidrolize. Digestat oz. trdni ostanek po fermentaciji smo prav tako uporabili pri testu encimske hidrolize, le tega smo pridobili po anaerobni fermentaciji LB v pilotnem sistemu. Digestat smo posušili pri temperaturi 60 °C, nato smo ga zdrobili na delce 0,2 do 0,5 cm s sekljalnikom Moulinex AR 1105.



Slika 3.1: LB iz CERO Gajke, različna sestava v različnih obdobjih.

3.1.2 Pšenični otrobi

Pšenične otrobe (PO) smo kupili v lokalnem mlinu Korošec (Zabovci). Pred uporabo v gojiščih za gojenje glive *P. ostreatus*, smo PO sušili pri temperaturi 60 °C v pečici na vroči zrak, da smo odstranili odvečno vlago.

3.1.3 Vcepek glive *Pleurotus ostreatus*

Sev glive *P. ostreatus* PLAB smo pridobili iz zbirke gliv Oddelka za lesarstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija. Micelijsko kulturo smo pripravili na petrijevih ploščah. Osnovno kulturo micelija smo gojili na krompirjevem glukoznem agarju (PDA), in sicer smo v 1 L destilirane vode raztopili $m = 39$ g PDA praha, sledila je sterilizacija pri temperaturi 121 °C za 25 min. V naslednjem koraku smo topel steriliziran PDA medij v laminariju prelili v sterilne petrijeve plošče. Vsako petrijevo ploščo smo inokulirali z micelijem in zatesnili s parafilmom. Pred uporabo smo petrijeve plošče inkubirali pri temperaturi 25 °C sedem dni. Po sedmih dneh smo petrijeve plošče s prerašenim micelijem predstavili na $T = 4$ °C, nadaljnje vzdrževanje aktivnosti kulture se je vršilo vsake 4 tedne po zgoraj opisanem postopku. Iz prerašene gojišča smo izsekali okrogle cepe s premera 6 mm, ter z njimi inokulirali gojišča v Erlenmajericah. Izgled prerašene PDA medija z micelijem je predstavljen na Sliki 3.2.



Slika 3.2: Micelij glive *P. ostreatus* PLAB gojen na PDA mediju, uporabljen kot inokulum na gojiščih v Erlenmajericah.

3.1.4 Anaerobna mikrobn biomasa

Anaerobno mikrobn biomaso, ki smo jo uporabljali v sistemu AMPTS II kot inokulum, smo pridobili iz komercialne bioplinske naprave, ki obratuje v mezofilnem temperaturnem območju ter se napaja pretežno z mešanico odpadnih kmetijskih surovin živalskega izvora in odpadkov živilskopredelovalne industrije.

3.2 Metode dela

3.2.1 Test biometanskega potenciala s sistemom AMPTS

Potencial LB in vzorcev prerašeni z glivo smo določili ali z avtomatskim testom bioplinskega potenciala v sistemu AMPTS II (BioProcess Control). Z eksperimentom smo želeli določiti biometanski potencial LB. Zanimal nas je tudi biometanski potencial vzorcev LB, na katerega smo nacepili glivo *P. ostreatus*, saj smo s tem želeli preučiti vpliv biološke predobdelave na proizvodnjo bioplina. LB smo pridobili iz CERO Gajke, vzorce smo odvzeli v mesecu avgustu in oktobru 2011. Zaradi heterogenosti vzorca LB, smo le tega najprej zmleli (vrtni drobilec Viking GE 250) in nato presejali skozi sito (8,0 mm). Sledila je sterilizacija materiala ($m = 350$ g) v 2,5 L steklenih kozarcih pri temperaturi 121 °C. Na tako pripravljen substrat smo nacepili micelij glive *P. ostreatus*. Kozarci so bili zaprti s pokrovi, na katerih so bile luknje premera 25 mm, ki so bile zaprte z vato. S tem je bil omogočen prehod zraka v kozarce in onemogočen ena okužba. Gojenje je potekalo v inkubatorju, pri konstantni temperaturi 22 ± 1 °C. Gliva je na vzorcih rastla različno dolgo, prav tako je bila vidna različna intenziteta rasti micelija na različnih vzorcih. Za določitev biometanskega potenciala smo izbrali vzorce z različnimi inkubacijskimi časi rasti micelija, ter vzorce, ki so bili različno prerašeni z micelijem: popolnoma prerašeni z micelijem, ali delno prerašeni z micelijem. Pregled vzorcev, uporabljenih za določitev biometanskega potenciala, je predstavljen v Tabeli 3.1.

Tabela 3.1: Oznake in karakteristike rasti glive na vzorcih, uporabljenih v sistemu AMPTS II za določitev biometanskega potenciala.

Vzorec	Oznaka	$t_{\text{gojenja}}/\text{dan}$	Videz rasti micelija
vhodni vzorec avgust	VHA	/	/
izhodni vzorec avgust 1	IZA1	79	aktivna
izhodni vzorec avgust 2	IZA2	114	aktivna
vhodni vzorec oktober	VHO	/	/
izhodni vzorec oktober 1	IZO1	66	šibka
izhodni vzorec oktober 2	IZO2	66	aktivna

Glavno enoto sistema AMPTS II predstavlja 15 reaktorjev, volumen posameznega reaktorja je 600 mL. Reaktorji so postavljeni v vodno kopel, vsak reaktor je opremljen z mešalom, ki zagotavlja mešanje substrata in inokuluma ter tako preprečuje nastajanje temperaturnega gradienta. Količina nastalega plina se meri s pomočjo plovne celice ($V_{\text{celice}} = 10$ mL) na katero je iz vsakega reaktorja izpeljan plin, meritve se beležijo na integriranem analniškem strežniku (Slika 3.3).



Slika 3.3: Sistem AMPTS II. (a) *on-line* beleženje koli ine nastalega bioplina, (b) termostatirana vodna kopel z reaktorji, (c) enota za odvzem vzorcev bioplina, (d) plovna celica za merjenje volumna nastalega bioplina.

3.2.1.1 Priprava inokuluma

Anaerobno biomaso, ki smo jo uporabili kot inokulum, smo takoj po odvzemu prepihovali z dušikom in jo termostatirali na 37 °C ($t = 30$ dni), z namenom porabe ve ine organske snovi, ki ne predstavlja mikrobne biomase. Upad na bazalni nivo smo ugotovili s spremljanjem proizvodnje plinske faze inokuluma s sistemom AMPTS. Po kon anem inkubiranju smo za potrebe testov bioplinskega potenciala inokulumu dolo ili suho snov (SS), organsko snov (OS) ter gostoto.

3.2.1.2 Sestava testnih mešanic v sistemu AMPTS

Po vnosu ustreznih vhodnih podatkov v program sistema AMPTS, nam je program izra unal potrebno koli ino substrata z znanimi karakteristikami, ki smo ga morali dodati v testno mešanico, da je obratoval sistem pri želeni obremenitvi, ki smo jo sami dolo ili. V program smo vnesli OS inokuluma (ut. %), OS substrata (ut. %), potrebno obremenitev reaktorja in maso testne mešanice. Postopek dolo evanja recepture za sistem AMPTS je dvostopenjski, saj smo morali od testne mešanice odvzeli vzorec, kateremu smo morali, zaradi kon nih prera unov, dolo iti OS, SS, kemijsko potrebo po kisiku (KPK), pH, itd. V našem eksperimentu, smo prvo sestavo testnih mešanic dolo evali za 400 mL, nato smo testni mešanici odvzeli 50 mL vzorca za namen analiz. Tako smo morali podatke popraviti na dejansko obratovalno prostornino testnih mešanic v sistemu AMPTS (350 mL).

Za potrebe prera unov za sistem AMPTS smo dolo ili gostoto inokuluma. Stehtali smo maso znanega volumna inokuluma ter po naslednji ena bi izra unali gostoto:

$$= \frac{m}{V} \quad (3.1)$$

kjer so:

- gostota, g/mL,
- m masa, g,
- V volumen, mL.

Na podlagi vnesenih podatkov je program izračunal potrebne količine vhodnih materialov po naslednjem postopku:

$$\frac{I}{S} = \frac{m_i \cdot OS_i}{m_s \cdot OS_s} \quad (3.2)$$

$$m_i + m_s = m_{tm} \quad (3.3)$$

kjer so:

- m_i masa inokuluma, g,
- OS_i organska snov inokuluma, g/g,
- m_s masa substrata, g,
- OS_s organska snov substrata, g/g,
- I/S razmerje med inokulumom in substratom,
- m_{tm} masa testne mešanice, g.

Reaktorje ($V_d = 350$ mL) smo obremenili z 1,5 g OS_s/OS_i ($SS_i = 25$ g/L, $OS_i = 15$ g/L oz. 55 % SS) in jih 56 dni inkubirali pri temperaturi 37 °C v dveh paralelkah. Vzporedno s testnimi mešanicami smo spremljali proizvodnjo bioplina v slepi in standardni kontroli. Slepo kontrolo, v kateri smo inkubirali inokulum, smo uporabili za spremljanje bazalne proizvodnje anaerobne mikrobne združbe. Po zaključku poskusa smo količine nastalega bioplina v testnih mešanicah korigirali na bazalno proizvodnjo slepe kontrole. Standardno kontrolo smo izvedli z dodatkom celuloze, ki velja za lahko razgradljivo snov. Potek anaerobne razgradnje v inkubiranih standardnih kontrolah je potrdil tehniki no pravilno izvedbo poskusov.

3.2.1.3 Postopek priprave mešanic testnih reaktorjev

V reaktor smo zmešali vnaprej izračunano količino inokuluma in vzorca. Mešanico smo dobro premešali in jo 10 min preprihovali z dušikom. S tem smo izgnali iz testne mešanice kisik. Po preprihovanju smo odlili 50 mL testne mešanice za opravljene analize. Do izvajanja analiz smo jih shranili v zamrzovalniku. Reaktorje smo nato nepredušno zaprli in jih namestili v vodno kopel pri temperaturi 37 °C. Prostor, ki ga v reaktorjih ni zavzela testna mešanica, smo za 5 min preprihovali z argonom (Ar). Le to smo izvedli z namenom izгона N_2 , saj smo med procesom anaerobne razgradnje spremljali tudi N_2 . Brez preprihovanja z Ar rezultati proizvodnje N_2 ne bi bili natančni. Za tem smo reaktorje povezali s sistemom cevk na preto ni merilec bioplina, zagnali smo mešanje v reaktorjih in preko razvalniškega sistema zagnali poskus. Med poskusom smo bili pozorni na nivo vode v vodni kopeli, v kateri so bili postavljeni reaktorji sistema AMPTS. Gladina je morala vedno segati do nivoja testnih mešanic v reaktorjih. Test smo ustavili, ko je bila proizvodnja bioplina minimalna, to je 1 do 2 NmL/dan.

3.2.1.4 Redukcija OS in KPK v sistemu AMPTS

Ob koncu procesa predstavlja redukcija OS in KPK rezultat pretvorbe organske snovi v bioplin, novo biomaso in presnovljeni substrat.

Redukcijo OS računamo po naslednjem postopku:

$$OS_{red} \left(\frac{g}{kg} \right) = (OS_{tmvh} - OS_{tmiz}) - (OS_{ivh} - OS_{iiz}) \quad (3.4)$$

$$OS_{red} (\%) = \frac{OS_{red} \cdot 100}{OS_{tmvh} - OS_{ivh}} \quad (3.5)$$

kjer so:

OS_{red}	redukcija OS, g/kg,
OS_{red}	delež redukcije OS, %,
OS_{tmvh}	za etna organska snov testne mešanice, g/kg,
OS_{tmiz}	kon na organska snov testne mešanice, g/kg,
OS_{ivh}	za etna organska snov inokuluma, g/kg,
OS_{iiz}	kon na organska snov inokuluma, g/kg.

Redukcijo KPK ra unamo po naslednjem postopku:

$$KPK_{red} \left(\frac{mg}{L} \right) = (KPK_{tmvh} - KPK_{tmiz}) - (KPK_{ivh} - KPK_{iiz}) \quad (3.6)$$

$$KPK_{red} (\%) = \frac{KPK_{red} \cdot 100}{KPK_{tmvh} - KPK_{ivh}} \quad (3.7)$$

kjer so:

KPK_{red}	redukcija KPK, mg O ₂ /L testne mešanice,
KPK_{red}	delež redukcije KPK, %,
KPK_{tmvh}	za etni KPK testne mešanice, mg/L,
KPK_{tmiz}	kon ni KPK testne mešanice, mg/L,
KPK_{ivh}	za etni KPK inokuluma, mg/L,
KPK_{iiz}	kon ni KPK inokuluma, mg/L.

3.2.1.5 Bioplinski in biometanski potencial

Merilo o ustreznosti testiranega substrata za pridobivanje bioplina je določeno z njegovim bioplinskim oz. biometanskim potencialom. Bioplin nastaja z razgradnjo organskih snovi, zato celokupno proizvodnjo bioplina podajamo na maso vhodne OS ali vhodne KPK vrednosti uporabljenih substratov.

$$BPP \left(\frac{NmL}{g OS} \right) = \frac{V_B}{OS_s} \quad (3.8)$$

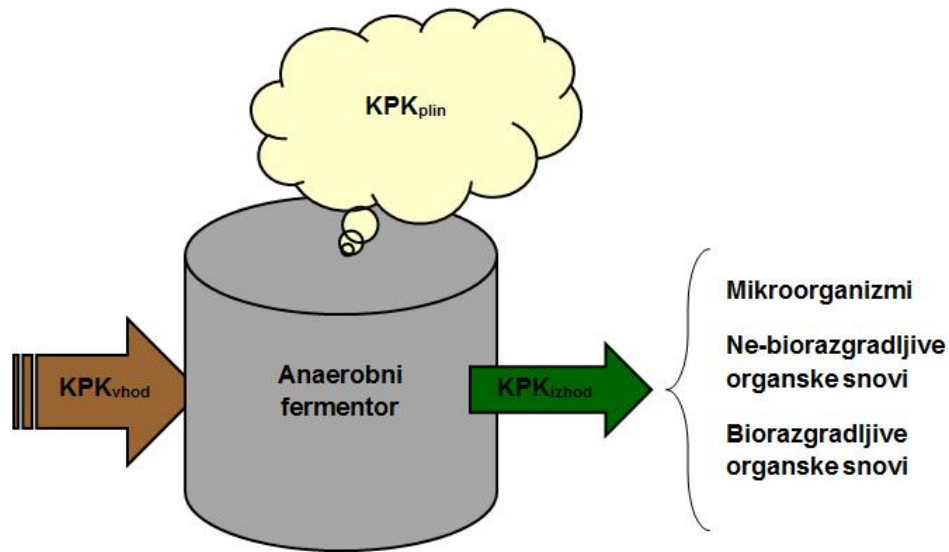
$$BMP \left(\frac{NmL CH_4}{g OS} \right) = \frac{V_{CH_4}}{OS_s} \quad (3.9)$$

kjer so:

BPP	bioplinski potencial, NmL/g OS
BMP	biometanski potencial, NmL CH ₄ /g OS,
V_B	celokupni volumen bioplina, NmL bioplina/mL testne mešanice,
V_{CH_4}	celokupni volumen metana, NmL CH ₄ /mL testne mešanice,
OS_s	organska snov vhodnega substrata, g OS/mL testne mešanice.

3.2.1.6 Masna bilanca/izplen metana v sistemu AMPTS

Masno bilanco v sistemih anaerobne fermentacije najlažje spremljamo na osnovi KPK bilance. KPK je namreč indirektno merilo za organsko snov. Definiran je kot količina kisika, ki je potrebna za oksidacijo snovi prisotne v vzorcu, z uporabo morganega oksidacijskega sredstva pod kislimi pogoji. KPK se izraža v mg O₂/L. V anaerobnih sistemih KPK ni uničen, ampak samo prerazporejen.



Slika 3.4: Shema masne bilance anaerobne fermentacije izražena z vrednostmi KPK

Izračun teoretičnega izplesa metana iz 1 kg substrata:

Predpostavljena enota biomase je naslednja:



kjer so:

C_n število atomov ogljika v biomasi,

H_a število atomov vodika v biomasi,

O_b število atomov kisika v biomasi.

Molarni volumen plina pri STP je 22,4 L/mol

Enota oksidacije, kot merila vrednosti KPK je naslednja:



Enota oksidacije metana je naslednja:



$$m(CH_4) = 16 \text{ g}$$

$$m(2 \cdot O_2) = 64 \text{ g}$$

$$KPK_{CH_4} = \frac{m(CH_4)}{m(2 \cdot O_2)} = \frac{16 \text{ g}}{64 \text{ g}} = 0,25 \frac{\text{g}(CH_4)}{\text{g}(O_2)} \quad (3.13)$$

$$V_{CH_4} = \frac{m_{CH_4}}{V_{STP}} = \frac{16 \text{ g}}{22,4 \text{ L}} = 0,71 \frac{\text{g}}{\text{L}} \quad (3.14)$$

1g CH_4 zavzema pri STP naslednji volumen:

$$V_{CH_4} = \frac{22,4 \text{ L}}{16 \text{ g}} = 1,4 \frac{\text{L}(CH_4)}{\text{g}(CH_4)} \quad (3.15)$$

Iz tega lahko povzamemo, da je 1g CH_4 ekvivalenten 4 g KPK in zavzema 1,4 L pri STP.

Iz tega sledi:

$$I_t = \frac{1,4 \frac{\text{L}(\text{CH}_4)}{\text{g}(\text{CH}_4)}}{4 \frac{\text{g}(\text{O}_2)}{\text{g}(\text{CH}_4)}} = 0,35 \frac{\text{L}(\text{CH}_4)}{\text{g}(\text{O}_2)} = 0,35 \frac{\text{m}^3(\text{CH}_4)}{\text{kg}(\text{KPK})} \quad (3.16)$$

Anaerobna razgradnja 1 kg substrata (ki je pretvorjen v KPK metana) ima teoreti ni donos $0,35 \text{ m}^3 \text{ CH}_4$.

Izplen metana:

Izplen metana ovrednotimo na osnovi biorazgradljivosti organske snovi. Koli ino metana izrazimo na reducirano koli ino KPK ali OS.

$$I_{\text{eks}} \left(\frac{\text{NL}(\text{CH}_4)}{\text{kg}(\text{redKPK/redOS})} \right) = \frac{V_{\text{CH}_4}}{m_{\text{redKPK/redOS}}} \quad (3.17)$$

Delež izplena metana izrazimo z razmerjem eksperimentalno izmerjeno proizvodnjo metana in teoreti no proizvodnjo metana.

$$I(\%) = \frac{I_{\text{eks}} \cdot 100}{I_t} \quad (3.18)$$

kjer so:

I_{eks} izplen metana iz eksperimenta, (NL $\text{CH}_4/\text{kg}_{\text{redKPK/redOS}}$),

I delež izplena, %,

I_t teoreti ni izplen metana, 350 NL/kg,

V_{CH_4} volumen metana na L testne mešanice, NL,

$m_{\text{redKPK/redOS}}$ masa reducirane KPK oz. OS na L testne mešanice, kg.

3.2.1.7 Energetska bilanca v sistemu AMPTS

Kurilna vrednost, ki nastane v procesu anaerobne razgradnje je podana z naslednjo ena bo:

$$H_c^{\circ} \text{CH}_4 \left(\frac{\text{kJ}}{\text{kg}} \right) = m_{\text{CH}_4} \cdot H_{\text{CH}_4} \quad (3.19)$$

pri emer je:

$$H_{\text{CH}_4} = 550619 \text{ kJ/kg}$$

kjer so:

$H_c^{\circ} \text{CH}_4$ kurilna vrednost metana na maso substrata, kJ/kg_{substrata},

H_{CH_4} kurilna vrednost metana, kJ/kg,

m_{CH_4} masa metana na g substrata, g.

Maso metana izra unamo po naslednji ena bi:

$$m_{\text{CH}_4}(\text{g}) = n_{\text{CH}_4} \cdot M_{\text{CH}_4} \quad (3.20)$$

pri emer je:

$$M_{\text{CH}_4} = 16,04 \text{ g/mol}$$

kjer sta:

n_{CH_4} množina metana glede na 1 g substrata, mol/g_{substrata},

M_{CH_4} molska masa metana, g/mol

Množino nastalega metana na 1g substrata izra unamo po naslednji ena bi:

$$n_{\text{CH}_4} \left(\frac{\text{mol}}{\text{g}} \right) = \frac{p \cdot V_{\text{CH}_4/\text{g}}}{R \cdot T} \quad (3.21)$$

kjer so:

- p tlak, kPa,
 $V_{\text{CH}_4/\text{g}}$ volumen nastalega metana na 1 g substrata, L/g_{substrata},
 T temperatura, K,
 R splošna plinska konstanta = 8,31 kPa·L/mol·K.

Volumen nastalega metana na 1 g substrata izra unamo po naslednjem postopku:

$$V_{\text{CH}_4/\text{tm}} = V_{\text{B}/\text{tm}} \cdot w_{\text{CH}_4/\text{tm}} \quad (3.22)$$

$$V_{\text{CH}_4/\text{g}_s} = \frac{V_{\text{CH}_4/\text{tm}}}{m_s} \quad (3.23)$$

kjer so:

- $V_{\text{CH}_4/\text{tm}}$ volumen metana iz testni mešanici, L,
 $V_{\text{B}/\text{tm}}$ volumen bioplina iz testne mešanice, L,
 $w_{\text{CH}_4/\text{tm}}$ volumski delež metana v bioplina iz testne mešanice,
 $V_{\text{CH}_4/\text{g}_s}$ volumen metana na 1 g substrata iz testne mešanice, L,
 m_s masa substrata v testni mešanici, g.

Izkoristek proizvodnje metana iz substrata za posamezno testno mešanico izra unamo po naslednji ena bi:

$$(\%) = \frac{H_{\text{cCH}_4}^{\circ}}{H_{\text{c}_s}^{\circ}} \cdot 100 \quad (3.24)$$

kjer je:

- $H_{\text{c}_s}^{\circ}$ kurilna vrednost substrata, kJ/kg.

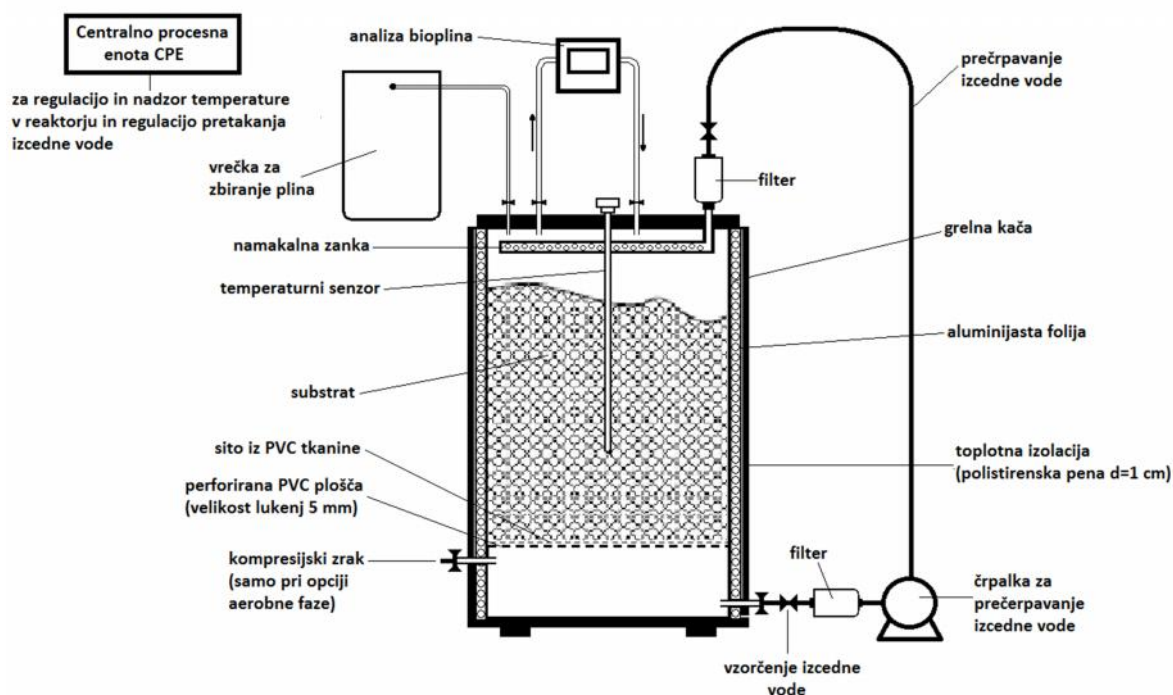
3.2.2 Anaerobna fermentacija v strnjenem sloju

3.2.2.1 Konstrukcija pilotnega reakcijskega sistema

Na rtovanje in izdelavo reaktorjev smo izvedli sami, pri tem smo poskušali s im manj stroški sestaviti sistem, s katerim bi lahko optimizirali proces anaerobne fermentacije v strnjenem stanju na pilotnem merilu. Sistem smo v prvi fazi sestavili iz 120 L plasti nih zabojnikov, vendar smo jih v nadaljevanju zamenjali s kovinskimi posodami, saj plasti ni zabojniki niso prenesli temperaturnih sprememb v sistemu anaerobne fermentacije pri termofilnem temperaturnem obmo ju.

Sistem smo sestavili iz treh kovinskih posod z zatesnjenim pokrovom, kar je zagotavljalo anaerobne pogoje v reaktorjih. Okrog reaktorjev smo ovili grelno ka o, ki smo jo iz zunanje strani izolirali, da ni prihajalo do prevelikih toplotnih izgub. S pomo jo grelnih kablov smo segrevali vsebino reaktorjev na 53 ± 2 °C. Temperatura je bila kontrolirana s termostatom. Med samim procesom smo temperaturo rektorjev spremljali s pomo jo temperaturnih senzorjev. Nad dno reaktorja smo namestili sekundarno dno, s tem smo zagotovili prostor za izcedno vodo (Slika 3.5 in Slika 3.6). Zaradi mo nega znižanja pH vrednosti v za etnih fazah anaerobne fermentacije (hidroliza in acidogeneza), smo pH v nasutem materialu uravnavali s pomo jo pretakanja izcedne vode med reaktorjem, pri katerem se je proces

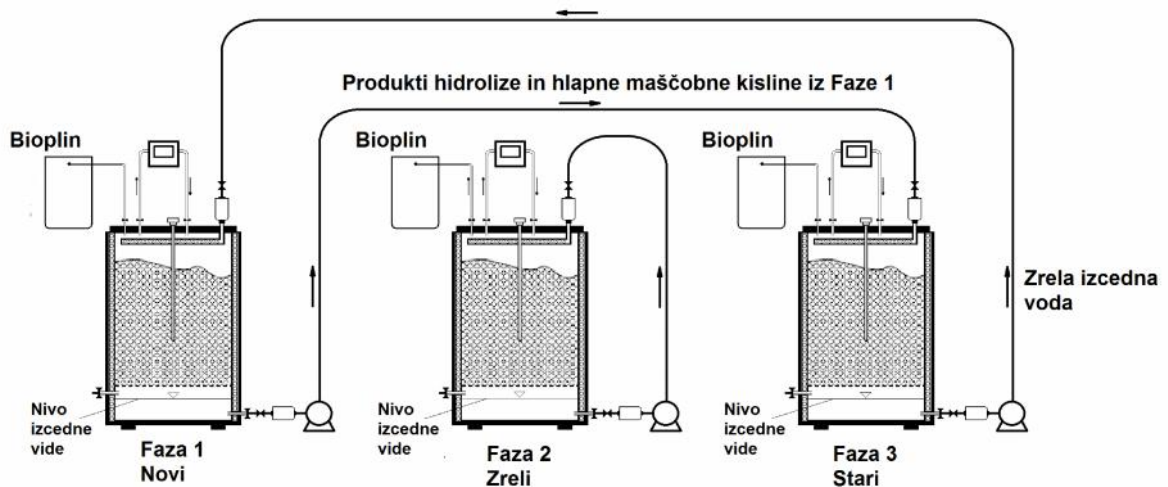
anaerobne fermentacije zaključi eval (stari reaktor) in med reaktorjem s sveže nasutim vhodnim materialom (novi reaktor), kot je prikazano na Sliki 3.7. Ob koncu procesa anaerobne fermentacije se je namre pH vrednost materiala in s tem tudi izcedne vode ustalila in je imela vrednost 7, lahko tudi nad 7. V za etku procesa anaerobne fermentacije je, zaradi razpada ve jih molekul ogljikovih hidratov, beljakovin in maš ob, vrednost pH zelo padla, lahko tudi pod vrednost 6. Zraven uravnavanja pH vrednosti v novem reaktorju, smo s pretakanjem izcedne vode prenesli mikroorganizme in hranila med reaktorji, kar je vplivalo na ve ji doprinos bioplina v procesu. Križno pretakanje smo prekinili, ko je vrednost pH v izcedni vodi novega reaktorja dosegla vrednost okrog 7. Pri aktivnem reaktorju, kjer je potekala metanogena faza, smo izcedno vodo obtakali iz dna reaktorja na vrh reaktorja (Slika 3.7). S tem smo v reaktorju zagotavljali konstantno vlago in enakomerno razporeditev mikroorganizmov in hranil. Izcedno vodo smo pretakali s pomo jo rpalk, na pokrovu reaktorjev je bila nameš ena namakalna zanka, ki je omogo ala enakomerno razprševanje izcedne vode po nasutem materialu v reaktorju. Sistem pretakanja izcedne vode smo opremili s filtri, ki so prepre evali vnos ve jih delcev v rpalko in namakalno zanko. Proizveden bioplina smo zbirali v vre ah za plin znanih volumnov.



Slika 3.5: Skica reaktorja.



Slika 3.6: Pilotni sistem treh reaktorjev anaerobne fermentacije med izvajanjem anaerobne fermentacije.



Slika 3.7: Shema pretakanja izcedne vode med reaktorji.

3.2.2.2 Masna bilanca pilotnega sistema

Masna bilanca posameznega reaktorja v pilotnem sistemu smo izrazili z redukcijo OS substrata, ki smo jo izražali po naslednjem postopku:

$$OS_{red}\left(\frac{g}{kg}\right) = OS_{vh} - OS_{iz} \quad (3.25)$$

$$OS_{red}(\%) = \frac{OS_{red} \cdot 100}{OS_{vh}} \quad (3.26)$$

3.2.2.3 Bioplinski in biometanski potencial pilotnega sistema

Bioplinski in biometanski potencial smo določili po Enabah 3.8 in 3.9 v razdelku 3.2.1.5.

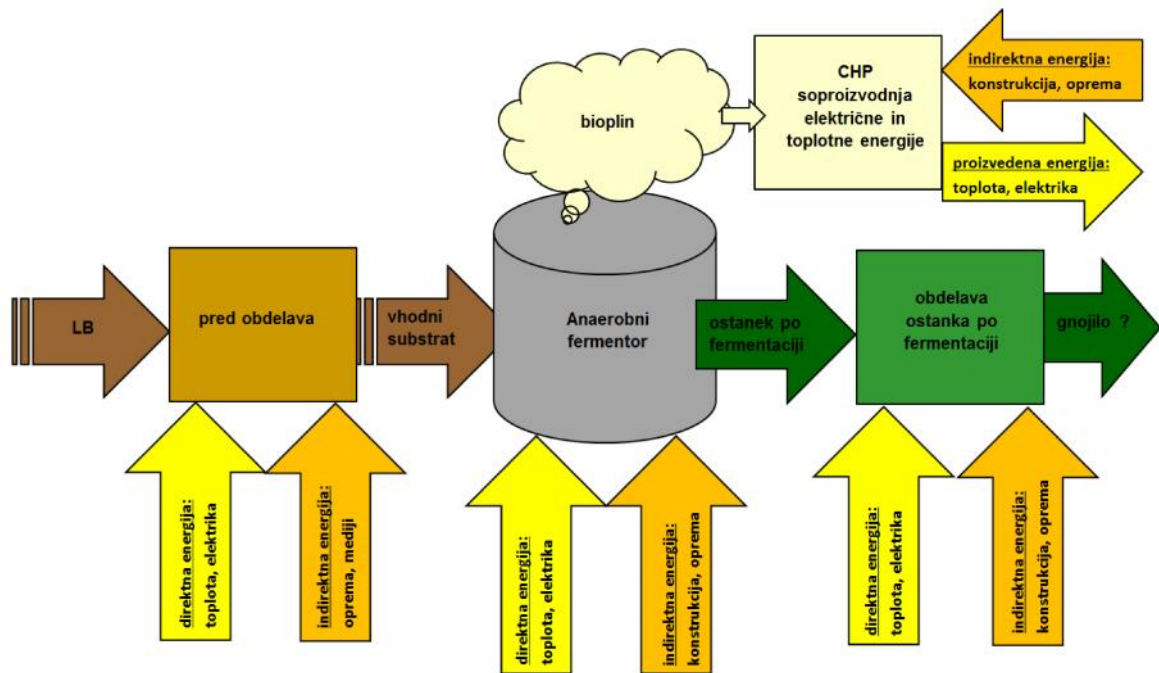
3.2.2.4 Kurilna vrednost metana iz pilotnega sistema

Kurilno vrednost metana iz pilotnega sistema smo izračunali po Enabahu 3.19 do 3.23.

3.2.2.5 Energetska bilanca pilotnega sistema

Vložek energije je sestavljen iz seštevka energije, ki jo sistem potrebuje za delovanje (Slika 3.8). Prva faza vložka energije, pri uporabi LB, se navezuje na porabo goriva in uporabo vozil, ki se uporabljajo za zbiranje LB v gozdovih, parkih, vrtovih, ... Nato sledi druga faza, in sicer predobdelava. Za LB je nujna mehanska predobdelava z različnimi drobilniki in mlini, ki zmanjšujejo velikost posameznih delov in s tem povečujejo aktivno površino za nadaljnjo predobdelavo ali za mikroorganizme v procesu anaerobne fermentacije. V tej fazi je tako potrebno gorivo ali električna energija, ki jo potrebujejo drobilniki in mlini za svoje obratovanje. Mehanski predobdelavi lahko sledi kemijska ali biološka predobdelava. Pri tej fazi nastanejo stroški različne opreme in drugega materiala, odvisno od uporabljene predobdelave. Tretja faza je proces anaerobne fermentacije v reaktorju. Indirektni stroški pri tej fazi so povezani s samim konstruiranjem reaktorja in vso dodatno opremo, ki pripada reaktorju za optimalno obratovanje (rpalke, merilni sistemi). Direktni stroški med obratovanjem procesa so povezani s potrebno toploto za delovanje reaktorja pri mezofilnem ali termofilnem temperaturnem območju. Ob tem je potrebna še električna energija za delovanje rpalke in merilnih sistemov. Po končani fazi anaerobne fermentacije, je potrebno ostanek po fermentaciji obdelati. Obdelava je odvisna od tega za kakšen namen se ostanek po fermentaciji uporabi in kakšne kakovosti je ostanek po fermentaciji. Kakovost ostanka je zelo odvisna od vhodnih surovin za anaerobno fermentacijo in izbrane predobdelave substratov. Kakorkoli, če ga želimo dodatno obdelati, potrebujemo dodaten zalogovnik. Glede na to, da ima ostanek po fermentaciji v večini vsebnost vlage nad 70 %, je potrebna dodatna energija za izločanje vlage iz ostanka. V kolikor je ostanek dobre kakovosti in ga uporabimo kot gnojilo, lahko energijsko vsebnost štejemo kot doprinos procesa. V šaržnem sistemu anaerobne fermentacije je, zaradi boljše stabilizacije procesa, priporočljivo del ostanka vračati nazaj v proces. V primeru fermentacije LB je v ostanku prisotnih veliko težko razgradljivih komponent. Glavna med njimi je lignin. S primerno predobdelavo ostanka po fermentaciji, lahko del ostanka vodimo nazaj v fermentacijo. To je priporočljivo pri ostankih, ki presegajo predpisane vrednosti za vračanje ostanka nazaj v naravo. Glavni doprinos pri anaerobni fermentaciji predstavlja proizvodnja bioplina in vsebnost metana v bioplenu. Večja kot je proizvodnja bioplina in večji kot je odstotek metana v njem, večji je doprinos energije in s tem učinkovitost procesa.

Bioplin se sežge na kogeneracijski enoti, ki je sestavljena iz kombinirane toplotne in električne enote. Pri sežigu tako nastaja toplota in električna energija. Bioplin zgoreva v plinskem motorju, ki poganja generator električne energije (1 m³ bioplina bo dal od 1,6 do 1,9 kWh električne energije, odvisno od koeficienta izkoristka kogeneracijske enote). Energija iz bioplina se pretvori na dva dela, dve tretjini energije se pretvorita v toploto in ena tretjina se spremeni v električno energijo [92].



Slika 3.8: Shema energetske bilance v pilotnem sistemu.

3.2.3 Proizvodnja lignoceluloznih encimov na trdnih gojiščih z glivo *Pleurotus ostreatus* in ekstrakcija encimov

Fermentacijo v trdnem stanju smo izvajali v 250 mL Erlenmajericah, v vsako erlenmajerico smo natehtali 5 g substrata in dolili rastni medij (kvasni ekstrakt 2,0 g/L, pepton 5,0 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,075 g/L, KH_2PO_4 1,0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L) za dosego 80 % vlage gojiš a. Vrednost pH medija je bila pred sterilizacijo uravnana na 6 z dodatkom 2 M NaOH. Erlenmajerice smo zatesnili z bombažno tkanino in paropropustno folijo ter jih avtoklavirali pri temperaturi 121 °C za 25 min. Gojiš a smo inokulirali s tremi okroglimi cepi i PDA preraš enega z micelijem glive *P. ostreatus*, premera 6 mm. Inokulacija je bila izvedena v laminariju pri asepti nih pogojih. Fermentacija v trdnem stanju je bila izvedena pri stati nih pogojih v temi in pri temperaturi 28 ± 1 °C. Gojiš a so bila inkubirana v 3, 6, 8, 10, 13, 15, 17 in 20 dnevnih intervalih.

Po kon ani inkubaciji smo v vsako Erlenmajerico dolili 40 mL ($c = 0,05$ M) citratnega pufra (pH 4,8). Erlenmajerice smo stresali pri 150 rpm za 1,5 h in pri sobni temperaturi. Temu je sledila filtracija, najprej smo brozgo prefiltrirali preko gaze, nato smo filtrat centrifugirali pri 3000 rpm za 20 min in pri temperaturi 4 °C. Supernatant smo ponovno filtrirali skozi 1,2 μm stekleni mikrovlaknasti filter (Whatman® GF/C). Encimski ekstrakt je bil uporabljen za dolo anje encimskih aktivnosti in encimsko hidrolizo, za poznejšo uporabo smo encimski ekstrakt zamrznili.

3.2.4 Optimizacija sestave gojišča za proizvodnjo lakaz glive *P. ostreatus* po Taguchi metodi

Metodologija optimizacije po Taguchi metodi vklju uje razli ne korake. V prvem koraku smo izbrali procesne parametre, ki smo jih želeli optimirati. V naslednjem koraku smo dolo ili število nivojev za procesne parametre in izbrali primerno ortogonalno matriko, ki smo jo preoblikovali na vrednosti procesnih parametrov. Za našo študijo smo izbrali L18

ortogonalno matriko, ki nakazuje osemnajst eksperimentov. Vsem faktorjem so bili dodeljeni trije nivoji, le pH vrednosti ravnega medija sta bila dodeljena dva nivoja. Taka razporeditev nivojev pripada Taguchi ortogonalni matriki L18 ($2^1 \times 3^7$) (Tabela 3.2). Naslednji korak je bil izvedba eksperimenta, ki je temeljil na ortogonalni matriki. Po končanem eksperimentu je sledila analiza eksperimentalnih podatkov in napovedovanje uinkovitosti izpeljane optimizacije s programsko opremo Minitab 17.

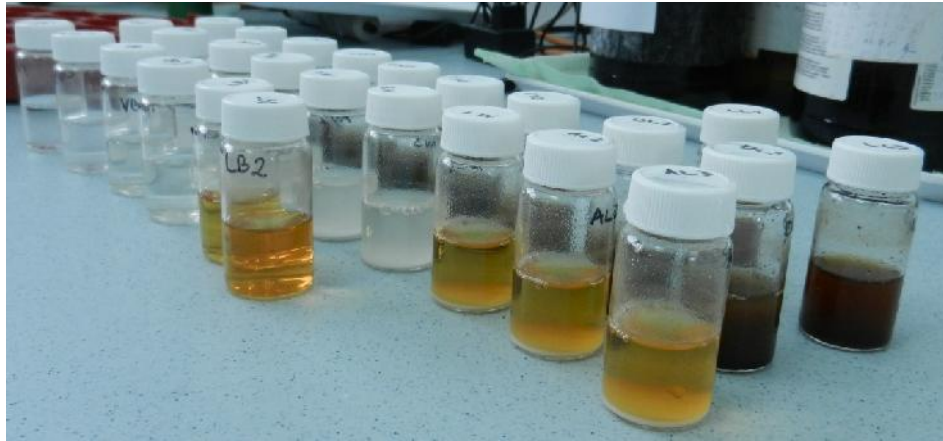
Tabela 3.2: Faktorji in nivoji eksperimentalnega načrtovanja

Zap. št.	Faktorji	Nivo 1	Nivo 2	Nivo 3
1	pH	5	6	
2	LB/%	0	10	20
3	glukoza/(g/L)	5	10	15
4	kvasni ekstrakt/(g/L)	2	4	6
5	pepton/(g/L)	5	10	15
6	KH ₂ PO ₄ /(g/L)	1	2	3
7	MgSO ₄ ·7H ₂ O/(g/L)	0,5	1	1,5
8	MnSO ₄ ·H ₂ O/(g/L)	0,075	0,1	0,125

3.2.5 Saharifikacija LB in ostanka po anaerobni fermentaciji z encimskim ekstraktom glive *Pleurotus ostreatus*

Encimski ekstrakt, pridobljen s fermentacijo *P. ostreatus* na gojišču sestavljenem iz 80 % pšeni nih otrobov in 20 % lignoceluloze, je med osmim in trinajstim dnevom fermentacije pokazal najvišje vrednosti encimskih aktivnosti. Med analiziranimi encimi je najvišje vrednosti dosegla aktivnost lakaz. Glede na pridobljene rezultate analiz encimskih aktivnosti, so bili za saharifikacijo lignoceluloznega materiala in digestata združeni encimski ekstrakti med osmim in trinajstim dnevom za zgoraj navedeno gojišču. Za oceno uinkovitosti saharifikacije encimskega ekstrakta, smo zraven tega uporabili še encimski kompleks *Aspergillus* sp. (Sigma-Aldrich, Nemija) in celuloze glive *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich, Nemija). Uinkovitost saharifikacije je bila ovrednotena na osnovi količine sprošeneh reduciranih sladkorjev lignocelulozne biomase in digestata ter mikrokristalini ne celuloze, ki je služila kot kontrolni substrat. Encimsko hidrolizo smo izvedli z obremenitvijo $0,27 \pm 0,02$ mg proteinov/mL. Vsebnost proteinov je bila na enaki ravni za vse uporabljene encime, saj smo izvajali primerjave saharifikacijske sposobnosti pri enakih obremenitvah, glede na vsebnost proteinov.

Razredeni encimski ekstrakt ($V = 10$ mL) v 50 mM citratnem pufru (pH 4,8) smo dodali k 1,5 g suhega substrata v 20 mL scintilacijskih steklenih steklenicah. Za preprečitev okužbe, smo dodali 100 μ L natrijevega azida ($= 20$ mg/mL). Reakcijske mešanice smo inkubirali 72 h pri temperaturi 50 °C na rotacijskem stresalniku pri 120 rpm. Po končanem inkubacijskem času smo hidrolizat inkubirali za 5 min v vreli vodni kopeli za deaktivacijo encimov in centrifugirali pri 3000 rpm za 20 min. Po končanem saharifikaciji, smo hidrolizat določili ali vsebnost glukoze. Eksperiment je bil izveden v treh paralelkah (Slika 3.9).



Slika 3.9: Izvedba encimske hidrolize v scintilacijskih vialah.

3.3 Analizne metode

3.3.1 Določanje suhe snovi (SS) in organske snovi (OS)

Koli ino suhe snovi (SS) in organske snovi (OS) v vzorcih smo dolo ili po standardni metodi [93]. Za dolo itev SS smo vzorce z dolo enim volumnom ali maso natehtali na predhodno stehtano kerami no izparilnico in jih sušili v sušilniku pri temperaturi 105 °C za 15 h do 20 h do konstantne mase. Po ohlajanju na sobno temperaturo v eksikatorju, smo vzorce stehtali za dolo itev SS.

Za dolo itev OS v vzorcih, smo vzorce za 2 h žarili v žarilni pe i pri temperaturi 550 °C. OS smo dolo ili z odštetjem ostanka pepela po žarjenju od vsebnosti SS v vzorcih.

$$SS \text{ (g/g)} = \frac{m_{ss}}{m_{vz}} \quad (3.27)$$

$$SS \text{ (%) } = \frac{m_{ss}}{m_{vz}} \cdot 100 \quad (3.28)$$

$$OS \text{ (g/g)} = \frac{m_{ss} - m_{as}}{m_{vz}} \quad (3.29)$$

$$OS \text{ (%) } = \frac{m_{ss} - m_{as}}{m_{vz}} \cdot 100 \quad (3.30)$$

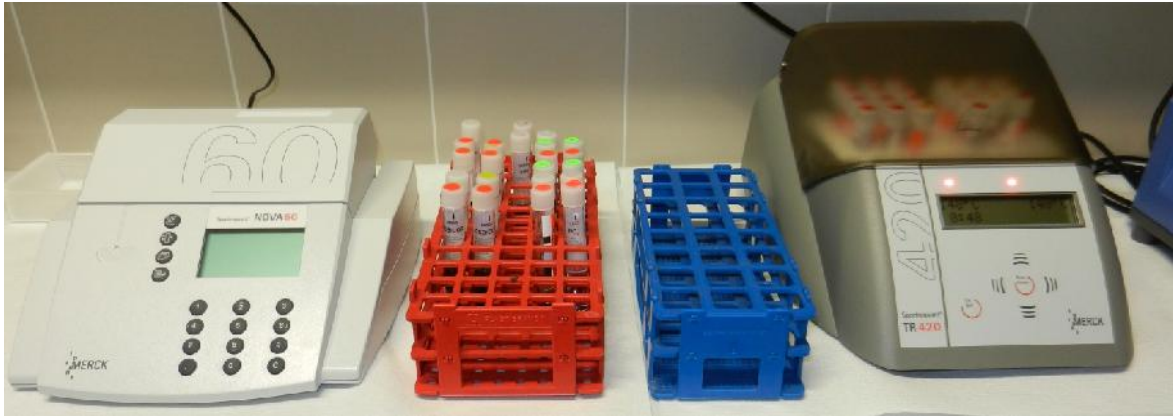
kjer so:

- m_{vz} masa vzorca, g,
- m_{ss} masa suhe snovi, g,
- m_{as} masa organske snovi, g,
- SS delež suhe snovi, g/g,
- SS odstotek suhe snovi, %,
- OS delež organske snovi, g/g,
- OS odstotek organske snovi, %.

3.3.2 Kemijska potreba po kisiku (KPK)

Kemijsko potrebo po kisiku (KPK) smo dolo ali spektrofotometri no s spektrofotometrom Spectroquant NOVA 60 (Merck) z grelno komoro Spectroquant TR 420 (Merck) (Slika 3.10). Za meritve smo uporabili celice s pripravljenimi reagenti, ki so omogo ale meritve KPK v obmo ju 500 do 10.000 mg/L (114555 COD Cell Test). Za dosego merilnega obmo ja smo vzorce po potrebi red ili in nato red itve upoštevali pri kon nih izra unih vrednosti KPK. Po dodatku vzorca v celice z reagentom, smo celice termostatirali 2 h v predhodno segreti grelni komori, v kateri je bila temperatura 148 °C. Po kon anem termostatiranju smo celice ohladili do sobne temperature in jim nato na spektrofotometru dolo ili vrednost KPK.

KPK se dolo uje na osnovi oksidacije vzorca z vro o žveplovo raztopino kalijevega dikromata s srebrovim sulfatom kot katalizatorjem. Klorid je prekrit z živosrebrovim sulfatom. Koncentracija zelenih Cr^{3+} ionov je nato dolo ena fotometri no.



Slika 3.10: Spektrofometer Spectroquant NOVA 60 (Merck) z grelna komora Spectroquant TR 420 (Merck) za določanje KPK.

3.3.3 Elementna C, H, N in S sestava

Elementna analiza ogljika, vodika, dušika in žvepla je namenjena določitvi osnovnih lastnosti substrata, kot je vsebnost beljakovin, ogljikovih hidratov ter C/N razmerje. Pred izvedbo analiz smo posušene vzorce zdrobili do finega prahu v granitni terilnici. Meritve smo izvedli na napravi CHNS Analyzer 2400 Series II (Perkin Elmer).

3.3.4 pH vrednost

Vrednosti pH v vzorcih smo merili z laboratorijskimi pH metri (Metrohm, model 827 pH lab, METTLER TOLEDO MP220, HACH HQ40d) po navodilih proizvajalcev pH metrov.

3.3.5 Določanje hlapnih maščobnih kislin v izcedni vodi s plinsko kromatografijo

Hlapne maščobne kisline smo kvantitativno določili z metodo plinske kromatografije (GC) povzete po metodi, ki so jo uporabili Dearman idr. [94]. Uporabili smo plinski kromatograf Hewlett Packard 6890 s FID detektorjem in avtomatskim injektorjem. Teko in vzorce (1 μ L) so bili injicirani v Nukol (polipropilen glikol spremenjen s tereftalno kislino) kapilarno kolono z dolžino 30 m, notranjim premerom 0,25 mm in debelino filma 0,25 μ m. Za nosilni plin smo uporabili helij in za reakcijski plin dušik. Temperatura injektorja je bila 220 °C in temperatura FID detektorja 250 °C. Koncentracije vzorcev so bile določene glede na standardno mešanico hlapnih maščobnih kislin znanih koncentracij (Volatile Free Acid Mix, Sigma). Pred analizo smo vzorce izcedne vode centrifugirali 10 min pri 3000 rpm in nato filtrirani skozi 0,45 μ m celulozne filtre.

3.3.6 Določanje vsebnosti celotnega dušika in celotnega organskega ogljika v izcedni vodi

Pred analizo smo vzorce stabilizirali z dodatkom klorovodikove kisline, s tem smo dosegli pH 2. Tako pripravljen vzorec smo lahko hranili v hladilniku pri temperaturi 4 ± 2 °C do osem dni. Analizo smo izvajali na instrumentu za določitev TOC in TN – Schimadzu TOC-V CPH/CPN total organic carbon analyzer. Določanje celotnega dušika se izvaja z oksidacijo vzorca s katalitičnim izgorevanjem v kisikovi atmosferi in temperaturi višji od 700 °C do dušikovega oksida. Kvantifikacija dušika poteka s kemiluminiscenčnim detektorjem (po reakciji z ozonom). Določanje organskega ogljika se izvaja z oksidacijo organskega ogljika do ogljikovega dioksida z izgorevanjem, ob dodatku ustreznega oksidanta. Vzorce smo pred izvajanjem analiz po potrebi redili, da smo dosegli območje

umeritvene krivulje za TOC ali TN. Umeritvene krivulje izriše ra unalniški program instrumenta, ki nam tudi poda rezultat koncentracije TN ali TOC za posamezni vzorec.

3.3.7 Določanje alkalnosti izcedne vode

Določanje alkalnosti izcedne vode pomeni koli ino NaOH, ki se porabi, da dosežemo določeno pH vrednost. Analizo smo izvajali s titratorjem Metrom z izmenljivo enoto za HCl. Najprej smo izvedli meritve za standard. K 10 mL ($c = 0,1$ M) NaOH smo dolili 190 mL destilirane vode. Tako pripravljeno raztopino smo titrirali z 0,1 M HCl. Za analize vzorcev je bil postopek enak, k 10 mL vzorca smo dolili 190 mL destilirane vode in titrirali z 0,1 M HCl.

3.3.8 Spremljanje sestave bioplina iz pilotnih reaktorjev s prenosnim merilnikom za analiziranje deponijskega plina

Meritve vsebnosti plinov v bioplenu smo izvajali s prenosnim merilnikom za analiziranje deponijskih plinov Geotechnical Instruments GA2000Plus. Merilnik smo s cevjo priključili ali direktno na reaktor, za ta namen sta bila dva venila na pokrovu reaktorja. Na en ventil smo priključili ali vhodno cev v merilnik, na drugi ventil pa izhodno cev iz merilnika. S takim načinom izvajanja meritev smo preprečili izgubo bioplina, saj merilnik deluje na tak način, da vrne plin iz reaktorja. Izmerjeni plin smo tako vračali nazaj v reaktor, tako da smo dobili realno količino proizvedenega bioplina med procesom anaerobne fermentacije v pilotnih reaktorjih. Po zagonu merilnika, le ta sam izvede meritve, vrednosti so konstantne po vsaki minuti delovanja merilnika.

Metan se izmeri na osnovi dvo-žarkovne infrarde (IR) absorpcije. Analizator se kalibrira s certificirano mešanico metana in tako so meritve pravilne, če v plinski zmesi ni prisotnih ostalih ogljikovodikovih plinov (npr. etan, propan, butan, itd.), ki vplivajo na natančnost izmerjenih vrednosti metana. Ogljikov dioksid je izmerjen z IR absorpcijo pri valovni dolžini specifični za ogljikov dioksid. Na meritve ogljikovega dioksida ne vplivajo drugi plini, ki jih najdemo v bioplenu. Senzor za detekcijo kisika je galvanska celica, na katero ne vplivajo ostali plini.

Na meritve ogljikovega monoksida vpliva prisotnost vodika v bioplenu. Če je koncentracija vodika v bioplenu nad 1 %, postanejo meritve za ogljikov monoksid natančne. Meritve ogljikovega monoksida so prav tako občutljive na vodikov sulfid v bioplenu. Prisotnost vodikovega sulfida povzroči previsoke zabeležene vrednosti vsebnosti ogljikovega monoksida. Zato pri meritvah ogljikovega monoksida uporabimo zunanji filter, v katerem se absorbira vodikov sulfid. Za meritve koncentracije vodikovega sulfida v bioplenu, izvedemo meritve brez uporabe zunanjega filtra. Na beleženje koncentracije vodikovega sulfida lahko vpliva prisotnost vsaj dveh plinov, in sicer SO₂ in NO₂, ki lahko povzročita 20 % nepravilnost v zabeleženih koncentracijah vodikovega sulfida [95].

3.3.9 Spremljanje sestave bioplina iz sistema AMPTS II na plinskem kromatografu

Med fermentacijo v sistemu AMPTS II smo spremljali sestavo plinske faze s pomočjo plinskega kromatografa (Agilent Technologies 7890A), opremljenega s kapilarnima kolonama HP-PLOT/Q in HP-MOLESIEVE. Meritve smo opravljali s 125 µL plina, ki smo vbrizgali v kromatografski sistem. TCD detektor v plinskem kromatografu je bil kalibriran na ogljikov dioksid, metan, dušik in vodikov sulfid.

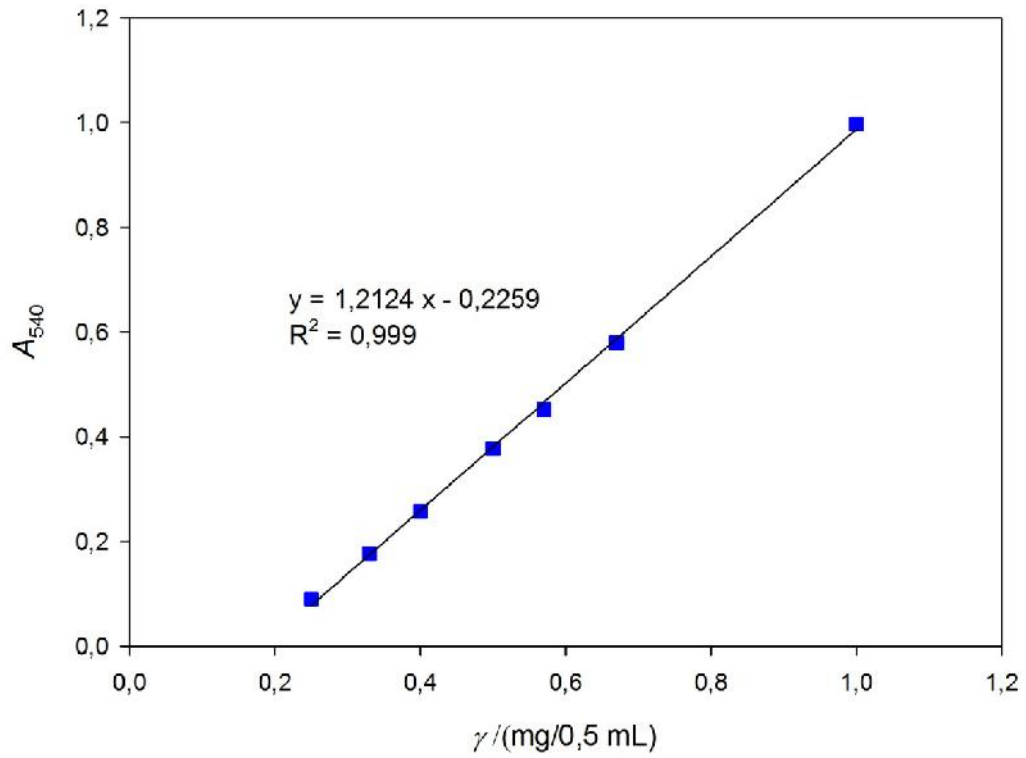
3.3.10 Določanje encimskih aktivnosti

– Priprava DNS reagenta

DNS reagent smo pripravili po metodi, ki jo je opisal Miller [96]. V 2 L aši smo zmešali 1416 mL destilirane vode, 10,6 g 3,5 dinitrosalicilne kisline in 19,5 g NaOH. Zmes smo raztopili do jasne raztopine v vodni kopeli ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nato smo dodali 306 g natrijevega kalijevega tartrata, 7,6 mL predhodno staljenega fenola in 8,3 g natrijevega metabisulfita. Ko so se v zmesi raztopile vse kemikalije, smo pripravljen DNS reagent prelili v temne steklenice in ga hranili pri temperaturi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

– Endo-1,4- -D-glukanaze (Karboksimetil celuloze) EC 3.2.1.4 (CMCaze)

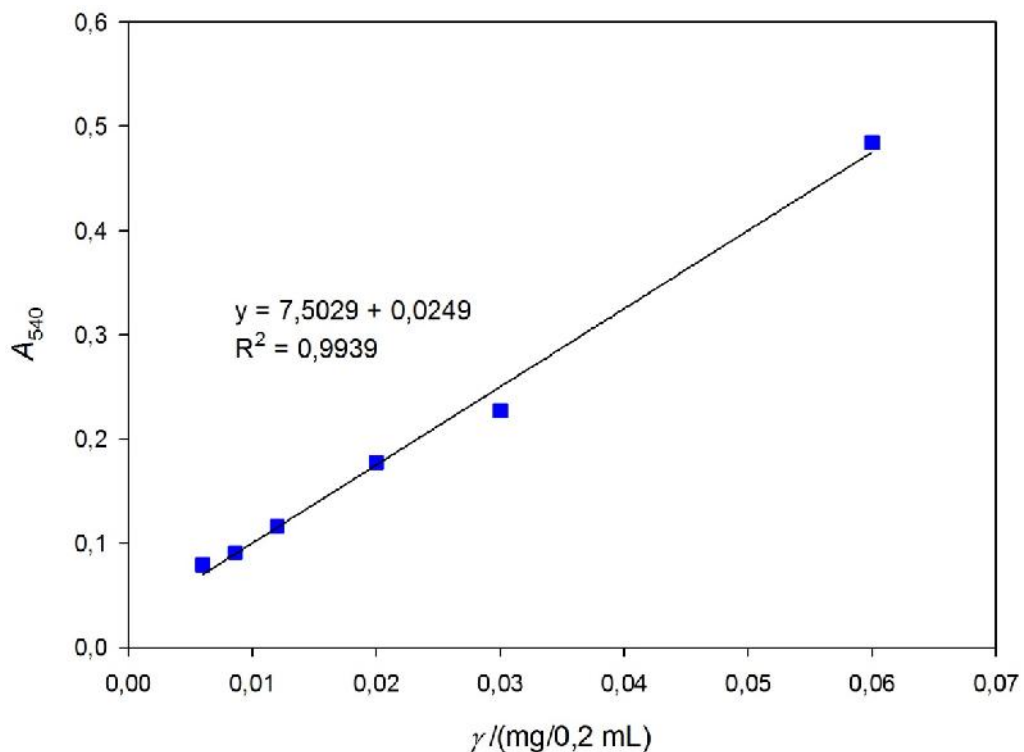
Endoglukanaze smo dolo ili spektrofotometri no pri 540 nm po metodi, ki so jo opisali Zhang idr. [97]. Kot substrat smo uporabili karboksimetil celulozo (Signa-Aldrich, Nem ija). Vzorec encima ($V = 0,5\text{ mL}$) smo inkubirali $0,5\text{ mL}$ 1% karboksimetil celuloze v citratnem pufu ($c = 0,05\text{ M}$, $\text{pH } 4,8$) pri temperaturi $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ za 30 min . Vse raztopine smo predhodno segreli v vodni kopeli na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nato smo dodali še v vodni kopeli 3 mL DNS reagenta (reagent dinitrosalicilne kisline), reakcijsko zmes smo za tem inkubirali 5 min v vreli vodni kopeli. Nato smo prestavili epruvete z raztopinami v mrzlo vodno kopel. Po ohladitvi reakcijske zmesi smo v vsako epruveto dolili 8 mL destilirane vode. Koli ino sproš enih reducirajo ih sladkorjev smo dolo ili z meritvami A pri $\lambda = 540\text{ nm}$, vrednosti A smo primerjali z vrednostmi na umeritveni krivulji, ki smo jo pripravili z uporabo razli nih koncentracij D-glukoze (mg/mL : 2,00; 1,33; 1,14; 1,00; 0,80; 0,67; 0,5) (Slika 3.11). Od od itanih A za encimske ekstrakte smo odšteli A slepega vzorca encima (encim brez substrata), s tem smo odpravili barvne motnje encimskega ekstrakta, in slepega vzorca substrata (substrat brez encima), s tem smo popravili ne encimske spremembe v barvi. Ena enota aktivnosti karboksimetil celulaz je definirana kot koli ina encima, ki sprosti $1\text{ }\mu\text{mol}$ reducirajo ih sladkorjev kot ekvivalent glukoze na minuto in specifi na aktivnost je število enot encimske aktivnosti na miligram proteinov encima.



Slika 3.11: Umeritvena krivulja za določanje CMCaz.

– *Ksilanaze EC 3.2.1.8*

Aktivnost ksilanaz smo spremljali s hidrolizo ksilana bukovega lesa po metodi, ki so jo opisali Bailey idr. [100]. 2 mL reakcijske zmesi je vsebovalo 1,8 mL 1 % ksilana pripravljenega v natrijevem citratnem pufru ($c = 5$ mM, pH 5,3) in 0,2 mL encimskega ekstrakta. Reakcijsko zmes smo termostatirali 5 min v vodni kopeli pri temperaturi 50 °C. Nato smo reakcijski zmesi dolili 3 mL DNS reagenta, ter dodatno termostatirali reakcijsko zmes v vreli vodni kopeli za 5 min. Sledilo je ohlajanje reakcijske zmesi v ledeni vodni kopeli na sobno temperaturo. Zraven vzorcev encimskega ekstrakta, so bili pripravljene še slepi vzorci substrata in slepi vzorci encima, za uravnavanje končne vrednosti A , ki je bila osnova za izračun aktivnosti ksilanaz. Sledilo je merjenje A pri $\lambda = 540$ nm. Pripravili smo tudi standardne raztopine ksiloze ($\mu\text{mol/mL}$: 10, 5, 3,33, 2, 1,43, 1) (Slika 3.14) za pripravo umeritvene krivulje. Ena enota aktivnosti ksilanaz je definirana kot količina encima, ki sprosti 1 μmol ksiloze na minuto pod standardnimi pogoji.



Slika 3.14: Umeritvena krivulja za določanje aktivnosti ksilanaz.

– Lakaze

Aktivnost lakaz v encimskem ekstraktu smo merili s spremljanjem oksidacije 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolilna-6-sulfonska kislina) (ABTS) [101]. Reakcijska zmes je vsebovala 0,4 mL ($c = 1\text{mM}$) ABTS (pripravljen svež v natrijevem acetatnem pufri), 1,2 mL ($c = 0,1\text{ M}$) natrijevega acetatnega pufra (pH 5) in 0,8 mL encimskega ekstrakta. Oksidacijo ABTS smo spremljali spektrofotometrično z določitvijo spremembe absorbance pri $\lambda = 420\text{ nm}$ ($\epsilon = 36.000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) z uporabo UV-Vis spektrofotometra (Hach Lange DR 2800). Encimski ekstrakt smo dodali v reakcijsko zmes tik pred meritvijo v spektrofotometru zaradi hitrega poteka reakcije oksidacije. Reakcijsko zmes smo pripravili direktno v 3 mL kivetih. Reakcijo smo spremljali 1 min z beleženjem vrednosti absorbance vsakih 10 sekund. Spektrofotometer je ob koncu meritve izrisal premico, linearna premica je predstavljala uspešno opravljeno meritev, v primeru izrisa nelinearne premice smo meritev ponovili z razrednim vzorcem encimskega ekstrakta. Ena enota aktivnosti lakaz je definirana kot količina encima, ki oksidira 1 μmol ABTS na minuto pod standardnimi pogoji.

Aktivnost lakaz smo izražali po naslednji enačbi:

$$\text{Aktivnost lakaz } \left(\frac{\text{U}}{\text{L}}\right) = \frac{A}{\Delta t \cdot d} \cdot \frac{V_{\text{rz}}}{V_{\text{vz}}} \cdot f \quad (3.31)$$

kjer so:

- $\frac{A}{t}$ sprememba absorbance po času, min^{-1} ,
- ϵ molarni ekstinkcijski koeficient, $\text{M}\cdot\text{cm}^{-1}$,
- d pot žarka, cm,
- V_{rz} celotni volumen reakcijske zmesi, L,
- V_{vz} volumen encimskega ekstrakta v reakcijski zmesi, L,
- f faktor reditve encimskega ekstrakta.

4 Rezultati in diskusija

4.1 Določitev biometanskega potenciala s sistemom AMPTS II

4.1.1 Karakterizacija inokuluma

Rezultate dolo itve SS, OS in gostote inokuluma prikazuje Tabela 4.1. SS inokuluma je bila $27,62 \pm 1,39$ g/kg, OS je bila $15,46 \pm 1,15$ g/kg in gostota $1,04 \pm 0,03$ g/mL.

Tabela 4.1: Lastnosti inokuluma uporabljenega v sistemu AMPTS

SS/(g/kg)	OS/(g/kg)	OS/%	/(g/mL)
$27,62 \pm 1,39$	$15,46 \pm 1,15$	$56,22 \pm 1,39$	$1,04 \pm 0,03$

Inokulum smo morali karakterizirati za potrebe nastavitve poskusa testnih mešanic sistema AMPTS. Do odstopanj v vrednostih, ki smo jih dolo evali, je prihajalo zaradi sprememb v sestavi vhodnega substrata komercialne bioplinarne, iz katere smo anaerobno biomaso odvzeli. Ker smo poskus izvajali v ve serijah, smo uporabili ve razli nih inokulumov. Rezultati se ujemajo s študijami, kjer so prav tako kot inokulum uporabili anaerobno biomaso, ki kot substrat uporablja praši jo gnojevko. Kim idr. [102] v svoji študiji uporabljajo inokulum s SS = 25 g/kg in OS = 12 g/kg.

4.1.2 Karakterizacija substratov

Ker se obremenitev reaktorjev v sistemu AMPTS dolo a glede na organsko snov vzorcev, smo vsem uporabljenim vzorcem v testu najprej dolo ili suho snov (SS), organsko snov (OS) in kemijsko potrebo po kisiku (KPK). Pri energetski bilanci smo potrebovali kurilne vrednosti vzorcev (H_c°), ki so poleg ostalih karakteristik vzorcev prikazane v Tabeli 4.2. Pri primerjavi vzorcev, na katerih ni bila gojena goba, ima višjo vsebnost suhe snovi (SS) in organske snovi (OS) vzorec, ki je bil zbran v mesecu avgustu (417 g/kg) v primerjavi z vzorcem, ki je bil zbran v mesecu oktobru (357 g/kg) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Vsebnost SS, OS, KPK ter H_c° vzorcev uporabljenih v sistemu AMPTS.

Vzorec	SS/ (g/kg vzorca)	OS/ (g/kg vzorca)	OS/ (% SS)	KPK/ (g/kg vzorca)	KPK/ (g/kg SS)	H_c° / (MJ/kg)
VHA	417	338	81	477	1144	16,66
IZA1	361	272	75	381	1055	15,81
IZA2	375	279	74	394	1051	16,23
VHO	357	315	88	438	1227	18,21
IZO1	296	249	84	360	1216	18,00
IZO2	298	251	84	350	1174	18,10

Odstopanja v sestavi so posledica vsebnosti različnih komponent LB, ki so se na dan zbiranja nahajale na Zbirnem centru. Günther idr. [91] v svoji študiji navajajo kalorične vrednosti različnih drevesnih vrst. Kalorične vrednosti se gibljejo med 17,9 in 20,5 MJ/kg. Iz tega lahko razberemo, da je kurilna vrednost vzorcev, ki smo jih uporabili v testu AMPTS, na spodnji meji kurilnih vrednosti lesa. V naših vzorcih je namreč velik delež trave, listja in okrasnih rastlin, ki znižajo celotno kurilno vrednost vzorca.

Pri primerjavi vsebnosti OS med vzorci na katerih ni bila gojena goba in vzorcih prerašanih z gobo, imajo vzorci prerašani z gobo nižje vsebnosti OS, kar je posledica gojenja gobe na substratih, saj *P. ostreatus* uporabi za svojo rast najprej lahko dostopno OS.

Enak trend, kot smo zaznali pri vsebnostih SS in OS, smo zaznali tudi pri vrednostih kemijske potrebe po kisiku (KPK). KPK je merilo za skupno količino organskih snovi v vzorcu (razgradljivih in nerazgradljivih) in primerjava vrednosti med vzorci kaže na večjo vsebnost organskih snovi v vzorcih, ki niso prerašani z gobo. Tako podatki za SS, OS in KPK prikazujejo enak trend porabljanja organskih snovi med procesom gojenja gobe.

Vrednosti analize CHNS za vzorce LB in vzorce prerašane z micelijem glive, ki so bili uporabljeni v testu določanja biometanskega potenciala so predstavljeni v Tabeli 4.3. Iz analize C, H, N, S vzorcev je razvidno, da je vsebnost ogljikovodikov v vzorcu, zbranem v oktobru, nekoliko boljše zastopana od vzorca, zbranega v mesecu avgustu (glede na deleža C in H). Vrednost ogljika za vzorec zbran v mesecu avgustu (VHA) je bila 41,58 % in za vodik 5,55 %. Vrednost ogljika za vzorec zbran v mesecu oktobru (VHO) je bila 44,16 % in za vodik 5,72 %.

Tabela 4.3: CHNS analiza vzorcev uporabljenih v sistemu AMPTS

Vzorec	C /ut. %	H /ut. %	N /ut. %	S /ut. %	C/N razmerje
VHA	41,58	5,55	1,91	0,57	22
IZA1	38,46	4,90	2,11	0,54	18
IZA2	38,19	4,78	2,33	0,57	16
VHO	44,16	5,72	1,96	0,62	23
IZO1	44,73	5,71	2,24	0,60	20
IZO2	44,01	5,56	2,19	0,60	20

Iz primerjave deležev posameznih komponent med vzorci VHA, IZA1 in IZA2 je razvidno, da gobe med svojo rastjo aktivno porabljajo ogljikovodike, kar je vidno pri nižanih deležih C in H pri vzorcih, na katerih je bila gojena goba. Tak trend pa ni viden pri vzorcih VHO, IZO1 in IZO2. Do razlik lahko prihaja zaradi različne vezave ogljikovodikov v sekundarne in terciarne spojine v substratih in zaradi različnih časovnih obdobij gojenja gobe na substratih, saj je bila goba na substratih IZO1 in IZO2 gojena 66 dni, medtem ko je bila na IZA1 gojena 79 dni in na IZA2 114 dni. Opazno je povečanje vsebnosti dušika v vzorcih prerašanih z gobo, medtem ko je vsebnost žvepla ostala na približno enaki ravni, kot v svežih substratih ali pa se je le minimalno zmanjšala. Glede na utežno razmerje med C/N, sta substrata brez glive v optimalnem območju za pridobivanje bioplina, ki je med 20 in 30.

4.1.3 Karakterizacija testnih mešanic

V Tabeli 4.4 so navedeni rezultati določevanja OS in KPK testnih mešanic na začetku inkubacije in na koncu inkubacije. Zraven je navedena količina nastalega bioplina v testnih mešanicah, ki je nastala iz količine organske snovi, dane v posamezno testno mešanico. OS, ki se je med procesom reducirala, znaša za vzorce neprerašene z glivo med 54,72 % (VHO) in 57,72 % (VHA). Reducirana OS, vzorcev prerašenih z glivo, je bila nižja, in se je gibala med 22,93 % in 38,21 %. Enak trend je bilo zaznati tudi za vrednosti KPK. Rezultati proizvodnje bioplina so pokazali najvišjo proizvodnjo za vzorca neprerašena z glivo (215,8 NmL/g_{OS} za VHA in 201,8 NmL/g_{OS} za VHO), medtem ko so bile vrednosti proizvodnje bioplina za prerašene vzorce na nižji ravni.

Tabela 4.4: Karakteristike testnih mešanic.

Vzorec	OS _{vh} / (g/kg)	OS _{iz} / (g/kg)	KPK _{vh} / (mg/L)	KPK _{iz} / (mg/L)	OS _{red} / %	KPK _{red} / %	V _B / (NmL/g _{OS})
Inokulum 1	14,88	13,12	24 395	24 250			
Inokulum 2	17,32	16,31	29 909	29 584			
VHA	24,01	16,98	40 360	30 888	57,72	58,42	215,8
IZA1	23,52	18,68	37 463	32 567	35,65	36,36	119,8
IZA2	24,43	21,79	39 450	34 575	22,93	47,69	88,1
VHO	23,25	16,91	38 560	31 550	54,72	48,46	201,8
IZO1	25,27	21,56	38 409	34 950	33,96	36,87	105,6
IZO2	24,57	20,79	37 625	34 875	38,21	31,43	103,1

Vrednosti OS in KPK testnih mešanic na začetku inkubacije so odraz razmerja med inokulumom in vzorci. V vseh testnih mešanicah je bilo razmerje med inokulumom in substratom 1,5. Iz rezultatov proizvodnje bioplina je razvidno, da je največ bioplina nastalo iz vzorcev, na katerih predhodno ni bila gojena goba. S tem potrjujemo naša predvidevanja, ki smo jih postavili že pri določevanju karakteristik vzorcev. Vzorci brez predhodno gojene gobe imajo namreč višjo vsebnost OS in KPK kot tudi H_c° . V teh vzorcih je tudi višje razmerje C/N v primerjavi z vzorci prerašenih z glivo. Gliva je bila na vzorcu IZA1 gojena 79 dni in na vzorcu IZA2 114 dni, proizvodnja bioplina je višja pri vzorcu, na katerem je bila gojena goba manj časa, kar pomeni, da je za svojo rast porabila manj organskih snovi, kot na vzorcu, na katerem je bila gojena dalj časa. Tako je v vzorcu IZA1 ostalo več organske snovi, ki so jo lahko mikroorganizmi pretvorili v bioplin. S temi rezultati dodatno potrjujemo ugotovitev, da gojenje glive *P. ostreatus* na vzorcih, ki jih nato uporabimo v procesu anaerobne fermentacije, negativno vplivajo na proizvodnjo bioplina oz. znižujejo proizvodnjo bioplina. Gojenje glive *P. ostreatus* na vzorcih pred procesom anaerobne fermentacije ni smiselno.

4.1.4 pH vrednost testnih mešanic

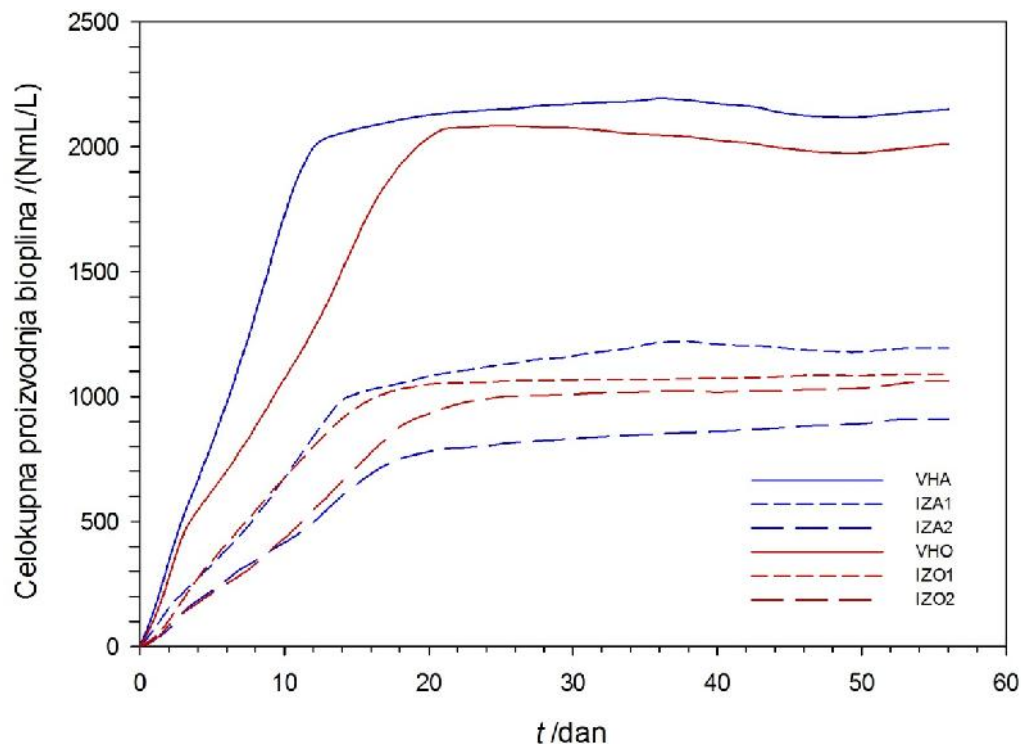
Tabela 4.5 podaja za etno in kon na pH vrednost testnih mešanic. eprav je pH vrednost nekoliko višja od optimalnih vrednosti, fermentacija ni bila zavirana v nobenem reaktorju. Iz pH vrednosti je razvidno, da so bile vrednosti na koncu procesa anaerobne fermentacije le nekoliko nižje od vrednosti na za etku procesa. Razlika se je gibala med 0,12 in 0,25. V vseh reaktorjih je fermentacija potekla do konca, kar pomeni da je potekla tudi metanogeneza, ki poskrbi za stabilizacijo pH vrednosti na koncu procesa.

Tabela 4.5: Za etna in kon na pH vrednost testnih mešanic.

Vzorec	pH _{vh}	pH _{iz}
Inokulum 1	8,36	8,27
Inokulum 2	8,47	8,44
VHA	8,14	7,95
IZA1	8,21	8,04
IZA2	8,42	8,29
VHO	8,21	7,96
IZO1	8,46	8,31
IZO2	8,48	8,36

4.1.5 Celokupna proizvodnja bioplina

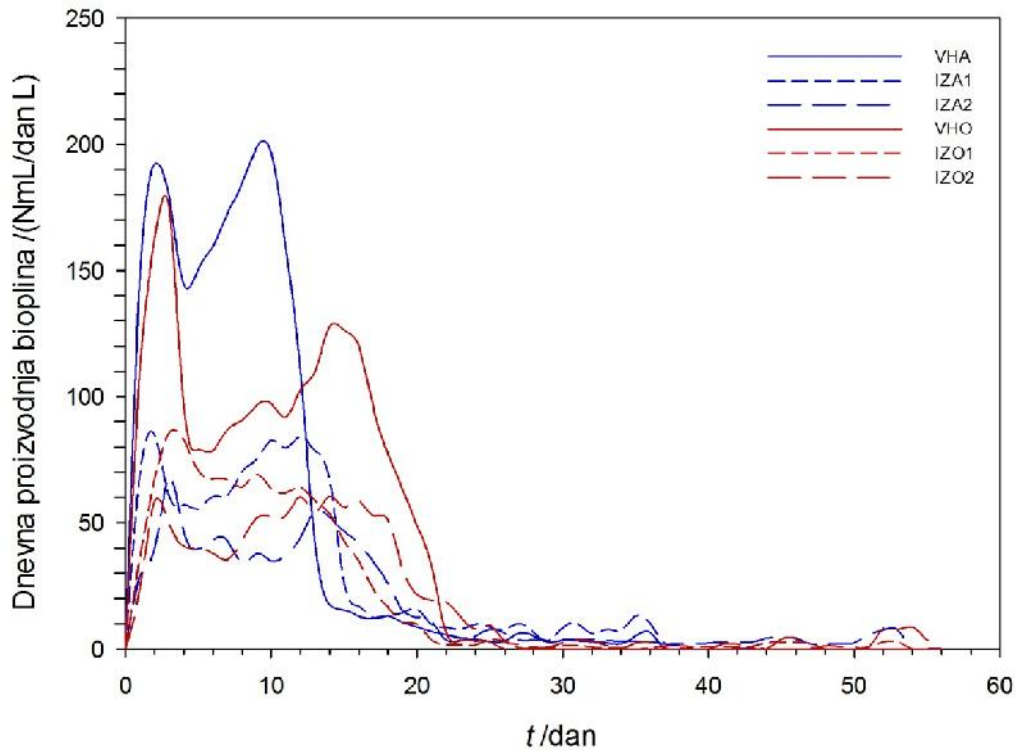
Slika 4.1 prikazuje trend nastajanja bioplina v reaktorjih za obravnavane vzorce. Najve bioplina je nastalo iz vzorcev, na katerih ni bila gojena gliva. Dinamika nastajanja bioplina pri vzorcih VHA in VHO kaže na po asnejšo nastajanje bioplina za vzorec VHO v primerjavi z vzorcem VHA. Predvidevamo, da je vzrok za prikazano dinamiko nastajanja bioplina lahko v strukturi substrata. Vzorec VHO lahko vklju uje kompleksnejše sekundarne in terciarne spojine ogljikovodikov, ki jih mikroorganizmi v anaerobni fermentaciji težje in po asneje razgrajujejo. Iz Slike 4.1 lahko razberemo tudi nastajanje bioplina v odvisnosti od asa. Ve ina bioplina je namre nastala v trinajstih dneh za vzorec VHA in v dvaindvajsetih dneh za vzorec VHO. Po tem obdobju je bila proizvodnja bioplina minimalna. Iz tega lahko razberemo zadrževalni as vzorcev v reaktorju, ki je iz energetskega vidika še smiseln, e želimo tak proces predstaviti v ve je merilo.



Slika 4.1: Celokupna proizvodnja bioplina izražena na liter testne mešanice.

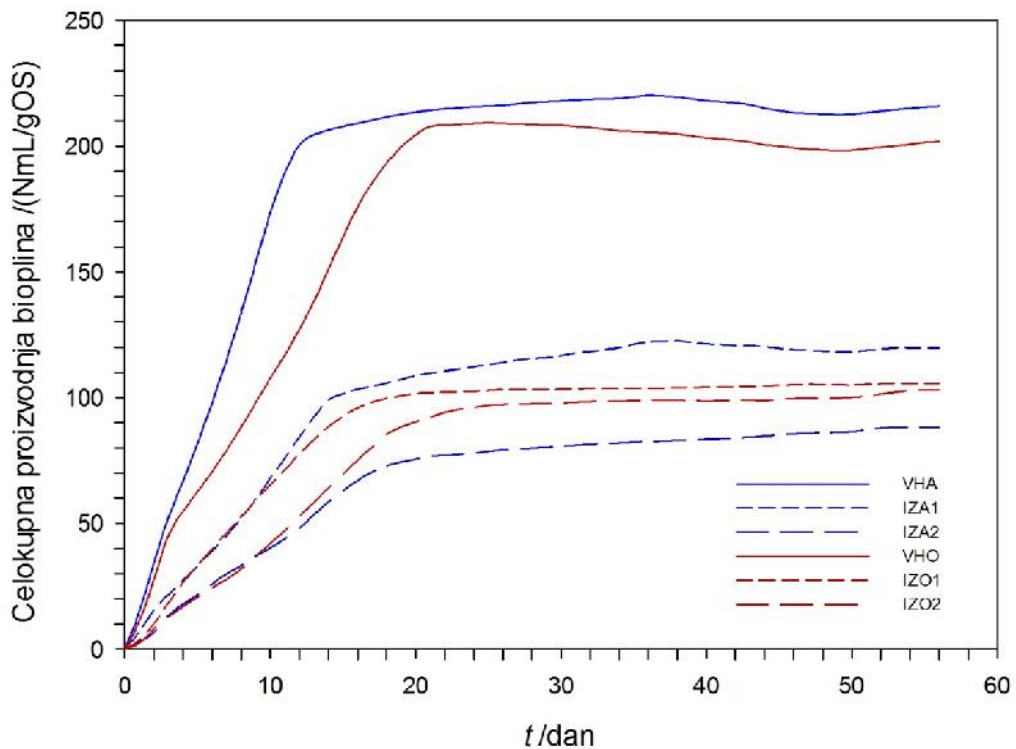
Ključnega pomena za proces anaerobne razgradnje je pozitivna energetska bilanca, kar pomeni, da mora proizveden bioplina v procesu dati več energije, kot je porabimo za delovanje procesa. Pri minimalni proizvodnji bioplina pozitivne energetske bilance ni mogoče doseči. Za vzorec VHA lahko tako določimo potrebni zadrževalni čas trinajst dni in za vzorec VHO triindvajset dni. Če v procese anaerobne fermentacije dodajamo substrate, katerih karakteristike se spreminjajo glede na časovna obdobja, kot je bilo tudi v našem primeru, je težko vnaprej določiti zadrževalni čas vzorcev v reaktorjih. S primerno opremo, s katero lahko sproti spremljamo pretok nastalega bioplina in vsebnost posameznih plinov v bioplina, lahko zadrževalni čas določimo ujemno sproti in tako zagotavljamo stabilnost in učinkovitost procesa. Vedno stremimo namreč k čim krajšim zadrževalnim časom in čim večji organski obremenitvi procesa. Pri tem pa moramo upoštevati tudi učinkovitost redukcije organske snovi in dejstvo, da ravno na koncu procesa nastaja največ metana.

Iz Slike 4.2 je razvidno, da ima pri vseh vzorcih dnevna proizvodnja bioplina dva vrhova. Že v prvem ali drugem dnevu fermentacije je opazen prvi vrh, nato proizvodnja malo pade in sledi še drugi vrh. Tak trend nastajanja bioplina je posledica karakteristike vzorcev. V procesu se najprej porabijo preproste spojine, ki so na voljo mikroorganizmom, kot so monosaharidi in amino kisline. Ko se porabijo lahko dostopne spojine, se v procesu začne proces hidrolize in acidifikacije. Mikroorganizmi po prilagoditveni fazi začnejo izločati encime, ki razgrajujejo polisaharide do monosaharidov, beljakovine do amino kislin in dolge verižne maščobne kisline do kratko verižnih maščobnih kislin. Med procesom razgradnje se tako začne ponoven dvig proizvodnje bioplina. S tem, ko je v reaktorju vse manj spojin, ki jih mikroorganizmi lahko razgrajujejo, začne tudi proizvodnja bioplina padati. Ko ostanejo v substratu še težko dostopne spojine, ki jih organizmi v anaerobni fermentaciji ne morejo predelati, se proizvodnja plina popolnoma ustavi.



Slika 4.2: Dnevna proizvodnja bioplina za preizkušane vzorce v sistemu AMPTS.

Slika 4.3 prikazuje bioplinski potencial, izražen z vsebnostjo organske snovi posameznega vzorca oz. organsko obremenitvijo posameznega reaktorja. Pri tem se za proizvodnjo bioplina upošteva upad organske snovi med procesom. Tako izraženi rezultati so najlažje primerljivi z rezultati drugih raziskovalcev.



Slika 4.3: Bioplinski potencial vzorcev izražen na OS substratov.

4.1.6 Biometanski potencial in redukcija OS in KPK

Biometanski potencial vzorca VHA znaša 145,8 NmL CH₄/g OS_s in za VHO 120,7 NmL CH₄/g OS_s. V primerjavi z vrednostmi iz literature sta ti vrednosti višji od vrednosti, ki jih navajajo Brown idr. [15], ki navajajo biometanski potencial za vrtno odpadke 49,3 in 59,7 NmL CH₄/g OS_s. Vrtni odpadki so v njihovem primeru sestavljeni iz trave, listja in vej, ki nastanejo v gospodinjstvih, ob inah in družbah za urejanje okolja, kar predstavlja sestavo substratov zelo podobno sestavi substratov, uporabljenih v predstavljeni študiji.

Pri primerjavi biometanskih potencialov med substrati, ki niso prerašeni z gobo in substrati, prerašeni z gobo, smo ugotovili, da se je biometanski potencial substratov, prerašeni z micelijem glive *P. ostreatus*, zelo znižal glede na vrednosti biometanskega potenciala za LB. Vrednost biometanskega potenciala je bila tudi nižja za substrat na katerem je bila gojena goba 114 dni od tistega na katerem je bila gojena 79 dni. Iz tega lahko sklepamo, da se z daljšim osnovnim obdobjem gojenja bukovega ostrigarja, biometanski potencial substrata znižuje. Tak rezultat je posledica razraščanja micelija. Daljša časa kot je micelij prisoten na substratu, več organskih komponent porabi za lastno rast in manj jih ostane za mikroorganizme v procesu anaerobne fermentacije (Tabela 4.6).

Na vzorcih IZO1 in IZO2 je bila goba gojena 66 dni, vendar smo zaznali različno intenziteto rasti micelija, kar je bilo vidno v primeru šibkejše rasti kot redka prepletenost micelija s substratom in v primeru aktivne rasti kot gosta prepletenost micelija s substratom. Ta razlika v intenziteti rasti micelija ni bistveno vplivala na vrednosti biometanskega potenciala. Biometanski potencial za vzorec IZO1 je bil 62,0 NmL CH₄/g OS_s in za IZO2 68,4 NmL CH₄/g OS_s.

Tabela 4.6: Bioplinski in biometanski potencial substratov.

Vzorec	V _B / (NmL/L)	BPP/ (NmL/ g OS)	BPP/ (NmL/ g KPK)	delež CH ₄ v bioplínu/ (vol. %)	BMP/ (NmL _{CH₄} / g OS)	BMP/ (NmL _{CH₄} / g KPK)
VHA	2150,14	215,81	152,94	67,6	145,80	103,33
IZA1	1193,71	119,80	85,47	65,6	78,60	56,08
IZA2	909,00	88,05	62,31	63,0	55,47	39,25
VHO	2010,86	201,83	145,13	59,8	120,66	86,77
IZO1	1090,57	105,58	72,98	58,7	61,99	42,85
IZO2	1063,93	103,06	74,00	66,3	68,37	49,09

Iz rezultatov zbranih v Tabeli 4.7 lahko povzamemo, da se je največje OS in KPK reduciralo v vzorcih VHA in VHO, pri katerih je bila vsebnost OS in KPK v vhodnem substratu najvišja. Prav tako je v teh vzorcih bila proizvodnja bioplina najvišja. S temi rezultati potrjujemo pravilnost vrednosti biometanskih potencialov uporabljenih vzorcev. Višja kot je redukcija OS oz. KPK višji je biometanski potencial vzorca.

Tabela 4.7: Redukcija OS in KPK med procesom anaerobne fermentacije v sistemu AMPTS.

Vzorec	OS _{red} /(g/kg)	OS _{red} /%	KPK _{red} /(g/L)	KPK _{red} /%
VHA	5,28	57,8	9,33	58,43
IZA1	3,08	35,7	4,75	36,36
IZA2	1,64	23,0	4,73	49,58
VHO	4,59	54,8	6,87	48,47
IZO1	2,70	34,0	3,31	39,00
IZO2	2,21	33,2	3,45	32,92

4.1.7 Izplen metana

Glede na to, da je teoreti na vrednost izplena CH₄ na reducirano koli ino 1 kg KPK $I_t = 350$ NL, lahko iz rezultatov v Tabeli 4.8 razberemo, da je bil izplen pri preu evanih vzorcih nizek. Predvidevamo, da je to posledica strukture vhodnih vzorcev, ki vsebujejo celulozo, hemicelulozo in lignin. Teh spojin mikroorganizmi v procesu anaerobne fermentacije niso sposobni razgraditi, medtem ko so zajete v koli ino KPK substrata.

Tabela 4.8: Izplen metana glede na reducirano KPK.

Vzorec	I _{eks} /(NL CH ₄ /kg KPK _{red})	I/%
VHA	155,73	44,5
IZA1	164,84	47,1
IZA2	121,05	34,6
VHO	175,11	50,0
IZO1	193,20	55,20
IZO2	204,49	58,43

4.1.8 Izkoristek proizvodnje metana

Tabela 4.9 prikazuje vrednosti izkoristka proizvodnje metana izra unanega iz razmerja kurilne vrednosti, ki nastane v procesu anaerobne razgradnje in kurilne vrednosti, ki jo imajo vzorci uporabljeni pri testu AMPTS. Kurilne vrednosti metana za posamezen vzorec so bile izra unane po ena bah opisanih v razdelku 3.2.1.6.

Ugotovili smo zelo nizke izkoristke proizvodnje metana, glede na kurilne vrednosti vzorcev (Tabela 4.9). Iz rezultatov lahko zaključimo, da je za boljši izkoristek procesa potrebna primerna predobdelava substratov.

Tabela 4.9: Izkoristek proizvodnje metana.

Vzorec	Δ_{metan} (MJ/kg _s)	Δ_{CH_4} (MJ CH ₄ /kg _s)	y /%
VHA	16,66	2,66	15,98
IZA1	15,81	1,19	7,52
IZA2	16,23	0,90	5,52
VHO	18,21	2,32	12,72
IZO1	18,00	0,96	5,32
IZO2	18,10	0,95	5,22

4.2 Anaerobna fermentacija v pilotnem sistemu

Najpomembnejši rezultati in dognanja anaerobne fermentacije v pilotnem sistemu se navezujejo na vpliv pretakanja izcedne vode na obravnavane parametre. Tako so v tem razdelku podani rezultati anaerobne fermentacije LB v trdnem stanju in termofilnem temperaturnem območju z vzpostavljenim križnim pretakanjem izcedne vode med reaktorji.

eprav smo skupno obravnavali šest vzorcev, so podani rezultati anaerobne fermentacije enega vzorca, saj v pilotnem merilu prihaja do razli no dolgega obdobja prilagajanja mikroorganizmov. Obdobja obtakanja izcedne vode, ki se navezujejo na uravnavanje pH vrednosti, so bila razli no dolga, prav tako so bili razli no dolgi tudi asi fermentacije, ki zavisijo od dnevne proizvodnje bioplina in od sestave bioplina. Predstavljeni rezultati opisujejo povpre en potek in rezultate anaerobne fermentacije LB v trdnem stanju z obtakanjem izcedne vode.

4.2.1 Karakterizacija substratov na vhodu in izhodu procesa anaerobne fermentacije

Iz rezultatov v Tabeli 4.10 je razvidno, da je delež organske snovi vhodnega vzorca (81,4 % SS) višji od deleža organske snovi izhodnega vzorca (64,7 % SS). Znižanje deleža organske snovi je posledica pretvorbe organske snovi v bioplin med procesom anaerobne fermentacije.

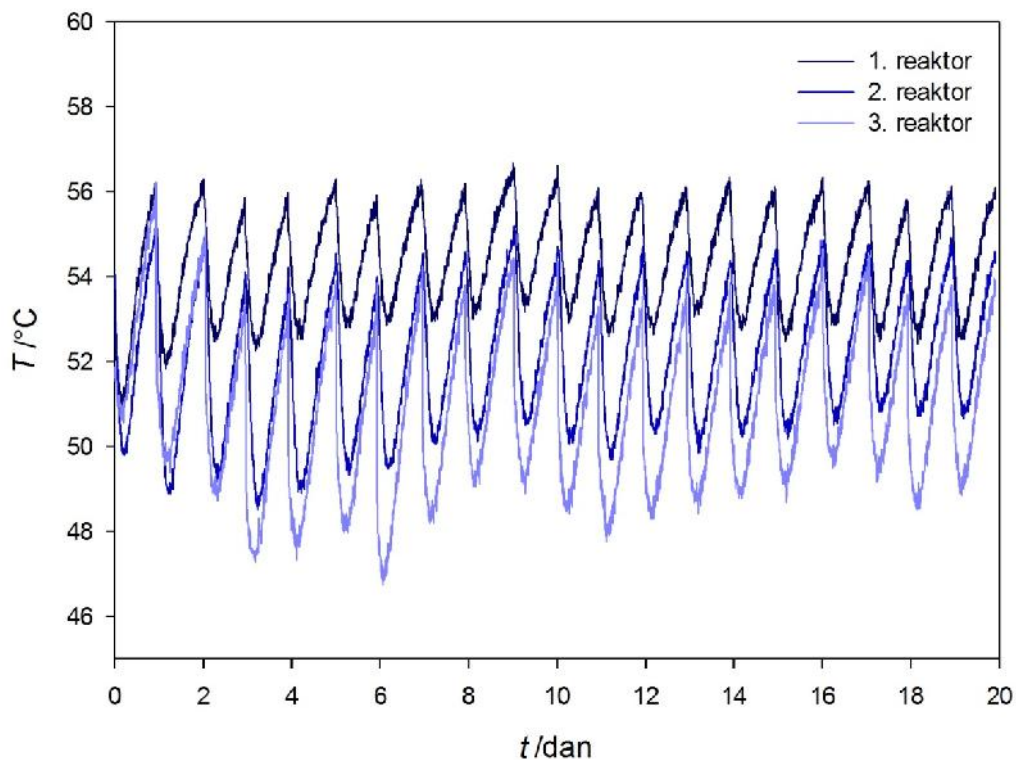
Karakterizacija substrata nam je omogo ila tudi izra un C:N razmerja iz rezultatov za vhodni vzorec. Uravnavanje razmerja C:N je klju nega pomena za rast bakterij. Splošno velja, da je optimalno razmerje C:N za anaerobno fermentacijo med 20 in 30. Za naš raziskovani vzorec je bilo razmerje C:N 62. Tudi Brown idr. [15] so imeli podobne vrednosti C:N pri fermentaciji v trdnem stanju za razli ne LB substrate. C:N razmerje za vrtno odpadke je bilo 55,3. Z dodajanjem dušika bi lahko znižali primanjkljaj hranil za bakterijsko združbo, vendar bi dodajanje dušika predstavljalo dodaten strošek. Boljša rešitev bi bila mešanje z dušikom bogatega substrata k LB.

Tabela 4.10: Vsebnost SS, OS, pH, dušika po Kjeldahlu in celotnega organskega ogljika v vhodnem in izhodnem vzorcu anaerobne fermentacije.

Vzorec	SS / (g/kg vzorca)	OS / (g/kg vzorca)	OS / % SS	pH	TKN / % SS	TOC / % SS
LB _{vh}	338,5	275,5	81,4	5,82	0,59	36,6
LB _{iz}	336,0	217,3	64,7	7,92	0,60	31,2

4.2.2 Temperaturni profil v reaktorjih med procesom anaerobne fermentacije

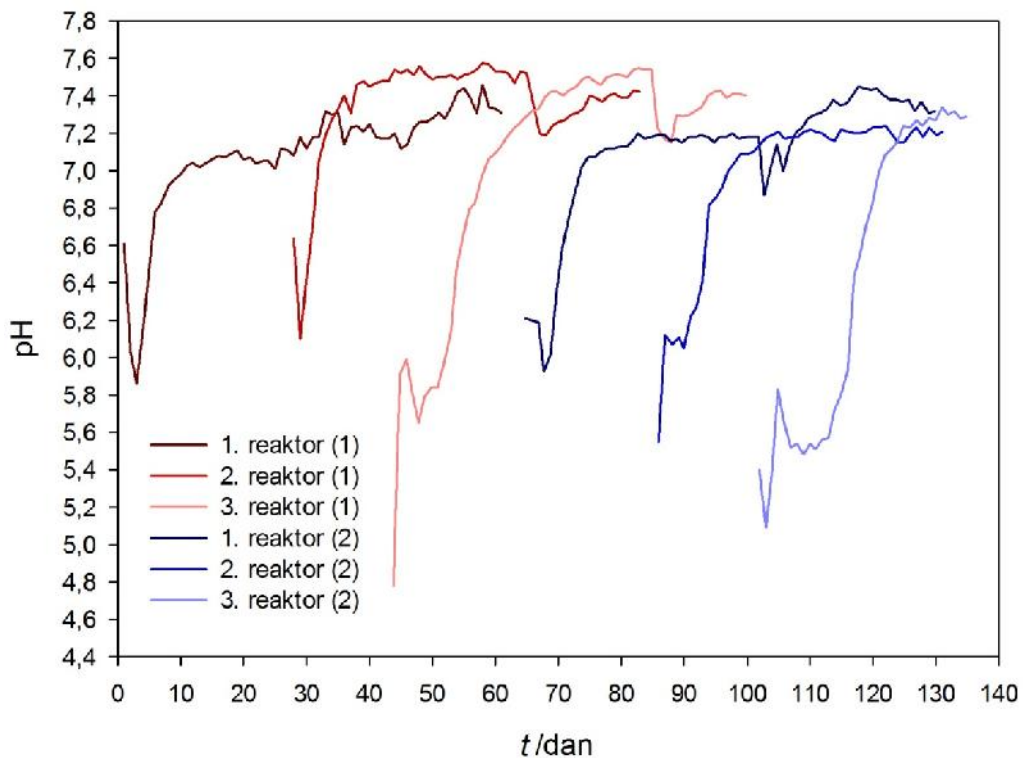
Temperatura v reaktorjih je dnevno nihala za 2 do 3 °C (Slika 4.4). Temperature smo beležili *on-line* s temperaturnimi senzorji, ki so bili postavljeni v sredini nasutega materiala v reaktorjih. Temperatura se je beležila na procesorju, in sicer je bila temperatura zabeležena vsakih 5 min. Vzrok za nihanje v temperaturi je v obtakanju izcedne vode med reaktorji. Izcedna voda se je zbirala na dnu reaktorjev, kjer je predvsem dno reaktorja predstavljalo velik vir toplotnih izgub, kar se je izrazilo pri nižji temperaturi izcedne vode. Ker smo izcedno vodo pretakali direktno med reaktorji, je to pomenilo, da smo segreti material v reaktorju s pretakanjem izcedne vode nekoliko ohladili, vendar se je temperatura v naslednjih urah ponovno dvignila. Kljub rahlemu temperaturnemu nihanju, smo bili vedno v območju termofilnega delovanja anaerobne fermentacije. Iz rezultatov proizvodnje bioplina in sestave bioplina ni bilo zaznati negativnega vpliva temperaturnega nihanja nasutega substrata v reaktorju. Rezultati temperaturnega profila v reaktorjih nakazujejo na pomanjkljivost pilotnega sistema, ki se nanaša na izolacijo reaktorjev. Dno reaktorjev ni bilo zadostno izolirano, hkrati bi morale tudi grelne kabele segreti do dna reaktorja, da bi bilo zagotovljeno tudi segrevanje izcedne vode.



Slika 4.4: Temperatura v reaktorjih pilotnega sistema med procesom anaerobne fermentacije v termofilnem temperaturnem območju.

4.2.3 Vpliv pretakanje izcedne vode na pH vrednosti izcedne vode

Iz rezultatov na Sliki 4.5 lahko razberemo nizko pH vrednost izcedne vode v za etku procesa, hiter dvig pH vrednosti do pH vrednosti 7 ali še višje. Proti koncu krivulj pH vrednosti je viden ponovni padec vrednosti. Hiter dvig pH vrednosti v za etku procesa posameznega reaktorja je posledica pretoka izcedne vode med starim in novim reaktorjem. V za etni fazi smo v novi reaktor uvedli izcedno vodo z visoko pH vrednostjo, hkrati so se hlapne maš obne kisline, ki so prisotne v izcedni vodi in znižujejo pH vrednost, odvedle iz novega reaktorja v stari reaktor. Na tak na in smo dosegli hitro stabilizacijo v procesu, kar je posledica hitrega dviga vrednosti pH izcedne vode. Drugi, manjši padec pH vrednosti je posledica drugega pretoka izcedne vode, ko je v reaktor uvedena izcedna voda iz novega reaktorja z nizko vrednostjo pH. Vrednost pH se po kon ani fazi drugega križnega pretoka ponovno dvigne in stabilizira, saj je v tej stopnji v procesu že potekla metanogena faza, kar pomeni, da je v sistemu mnogo aktivnih mikroorganizmov, ki zlahka razgradijo spojine, ki so s svežo izcedno vodo uvedene v stari reaktor.

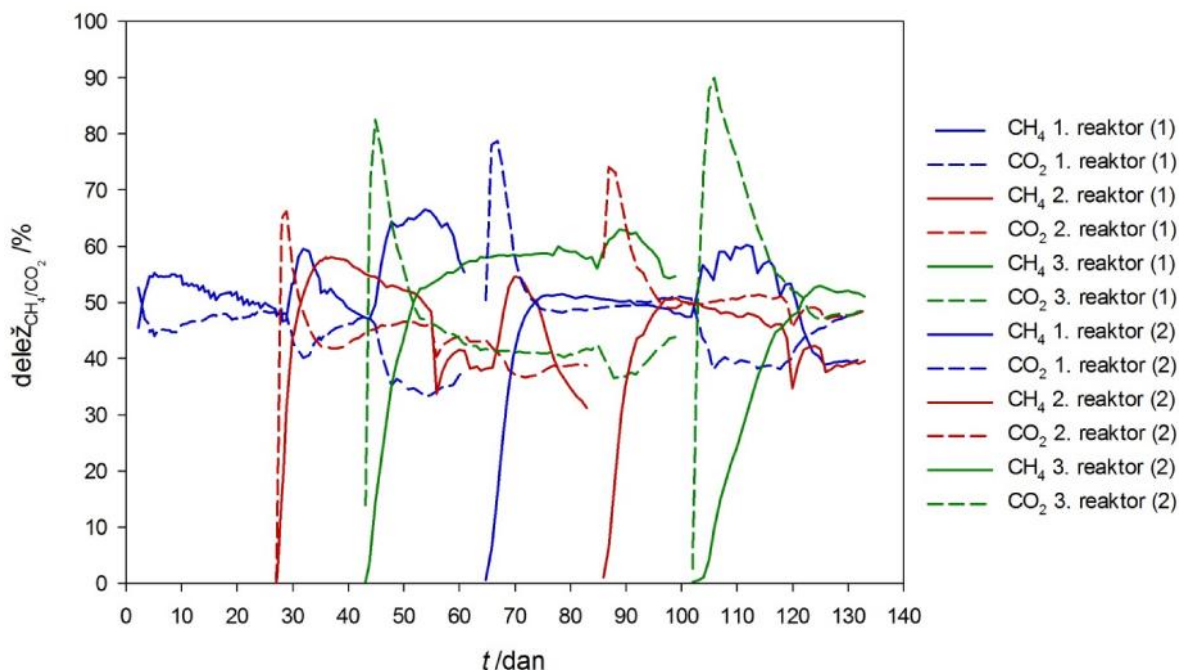


Slika 4.5: Vrednost pH izcedne vode v reaktorjih anaerobne fermentacije iz dveh zaporednih serij.

Na Sliki 4.5 so predstavljene pH vrednosti v reaktorjih pilotnega sistema. Predstavljeni sta dve zaporedni seriji, v vsaki seriji so obratovali trije reaktorji. Reaktorji so se v proces vklju evali s asovnim zamikom zaradi pretakanja izcedne vode med reaktorji, ki so bili v razli nih fazah procesa.

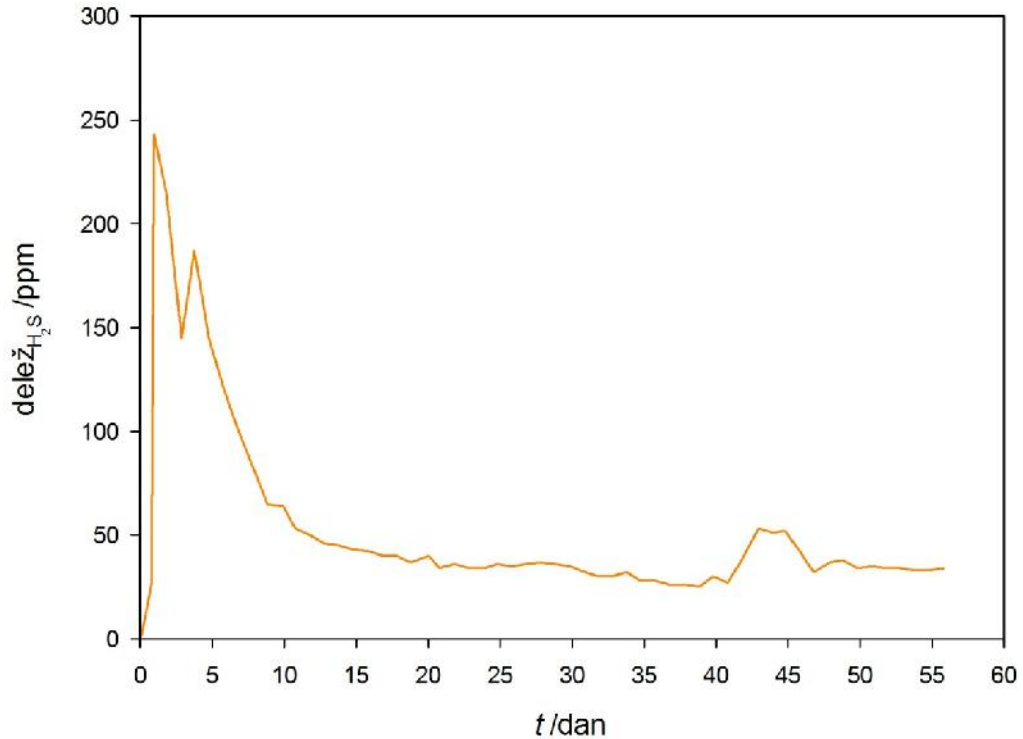
4.2.4 Vpliv pretakanja izcedne vode na sestavo bioplina

Iz Slike 4.6 je razviden hiter dvig vsebnosti CO₂. Z naraščajočim deležem CH₄ je za del delež CO₂ v bioplenu upadati do nivoja, ko se je ustalil pri vsebnosti med 40 % in 50 %. Po stabilizaciji procesa anaerobne fermentacije je bil delež CH₄ v bioplenu med 50 % in 60 %. Med posameznimi reaktorji ni vidnih večjih odstopanj v vsebnosti CO₂ in CH₄ v bioplenu. Enako kot pri vrednostih pH v izcedni vodi, je tudi pri deležih CO₂ in CH₄ zaznati vpliv pretakanja izcedne vode med reaktorji, kar je zaznati v zelo hitri rasti vsebnosti CH₄ v bioplenu v začetni fazi, ko se v reaktorju izmenja sveža izcedna voda z izcedno vodo iz starega reaktorja. Ta križni pretok pripomore k hitrejšemu zagonu anaerobne fermentacije in k preprečitvi zakisanja reaktorja. Pri vseh reaktorjih je viden porast vsebnosti metana v bioplenu v zadnji fazi obratovanja reaktorja. Porast v tej fazi je posledica drugega pretoka izcedne vode. Pri tem pretoku je t.i. zrela izcedna voda izmenjana z izcedno vodo v reaktorjih, ki je v začetni fazi zagona procesa. Ker se iz svežega materiala prenesejo v reaktor, pri katerem se proces anaerobne fermentacije že končuje, sveža hranila in mikroorganizmi, se vsebnost metana ponovno poveča. Enak trend je zaznati tudi pri vsebnosti H₂S v bioplenu, ki je prikazan na Sliki 4.7.



Slika 4.6: Delež CH₄ in CO₂ v bioplenu iz reaktorjev anaerobne fermentacije 2 zaporednih serij.

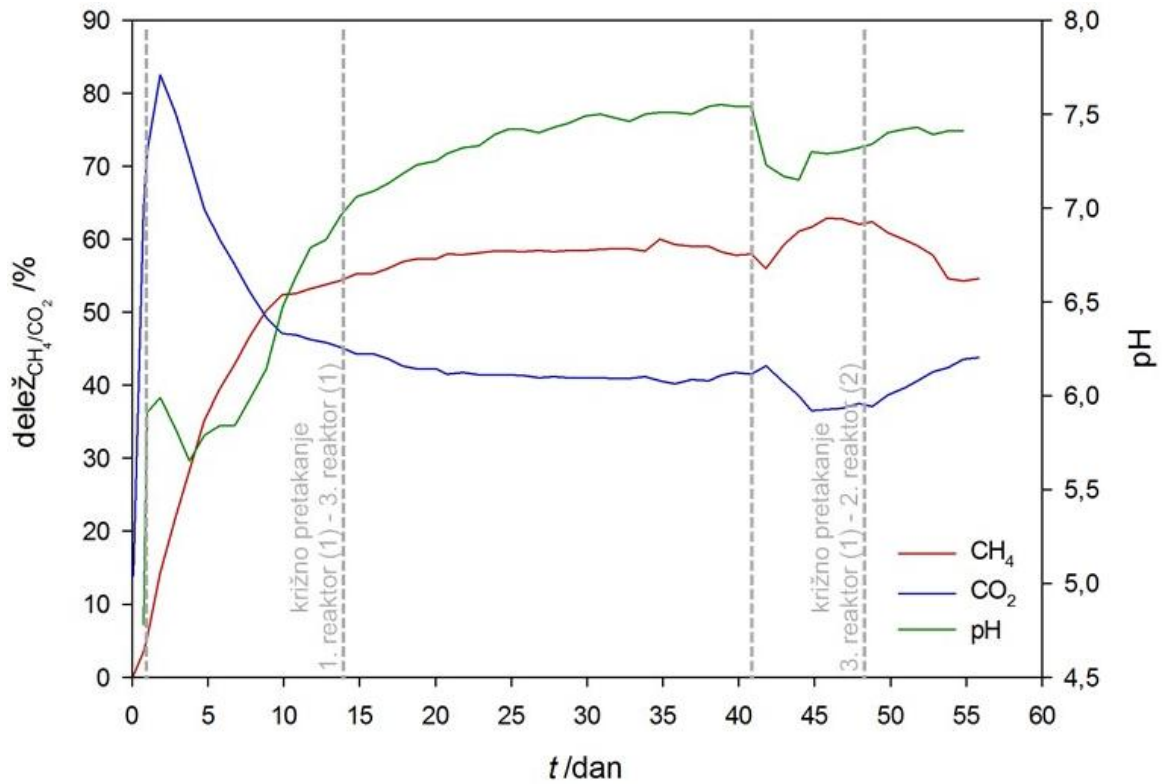
Najvišja vsebnost H₂S je bila v začetni fazi procesa, to je v stopnji hidrolize. V tej stopnji se razgrajuje organski material v osnovne gradnike. Prisotnost žvepla je vezana v strukturi proteinov, ki so prisotni v organskem materialu. Encimi mikroorganizmov tako razgradijo proteine med drugim tudi do H₂S. Po začetni fazi pade vsebnost H₂S na minimalne vrednosti, nekoliko naraste v drugi fazi pretoka izcedne vode, kar je posledica prisotnih proteinov v sveži izcedni vodi, ki se v starem reaktorju razgradijo (Slika 4.7).



Slika 4.7: Vsebnost H₂S v enem reaktorju pilotnega sistema anaerobne fermentacije.

Slika 4.8 prikazuje vpliv pretakanja izcedne vode na vrednosti pH izcedne vode ter vsebnosti CO₂ in CH₄ v bioplina. Z združitvijo pH vrednosti in sestavo bioplina na istem grafu, ter nazorno dolo itvijo faz pretoka izcedne vode, je vpliv pretoka izcedne vode še bolj nazorno prikazan. Predstavljeni rezultati so iz 3. reaktorja 1. serije, ki so prikazani tudi na Sliki 4.5 in Sliki 4.6.

S rtkanimi rtami so nazorno prikazana faze, v katerih smo izvajali pretakanje izcedne vode. V vmesni fazi med pretokoma izcedne vode smo tudi izvajali pretakanje izcedne vode kot je prikazano na skici iz Slike 3.7. V tej fazi je sestava bioplina konstantna, prav tako je konstantna tudi vrednost pH v izcedni vodi. Na Sliki 4.8 je to obdobje med 14. in 42. dnev obratovanja procesa. V tej fazi se izcedna voda pretaka iz dna reaktorja na vrh reaktorja, kjer se preko namakalne zanke enakomerno razprši po nasutem substratu v reaktorju. Glavni namen obtakanja izcedne vode v aktivnem reaktorju je vzdrževanje vlage v procesu in enakomerna porazdelitev hranil in mikroorganizmov. Pretakanje izcedne vode ne vpliva samo na sestavo bioplina in vrednost pH v izcedni vodi, ampak tudi na koli ino nastalega bioplina posameznega reaktorja.



Slika 4.8. Vpliv pretakanja izcedne vode na vrednost pH v izcedni vodi in na deleže CO_2 in CH_4 v bioplinu.

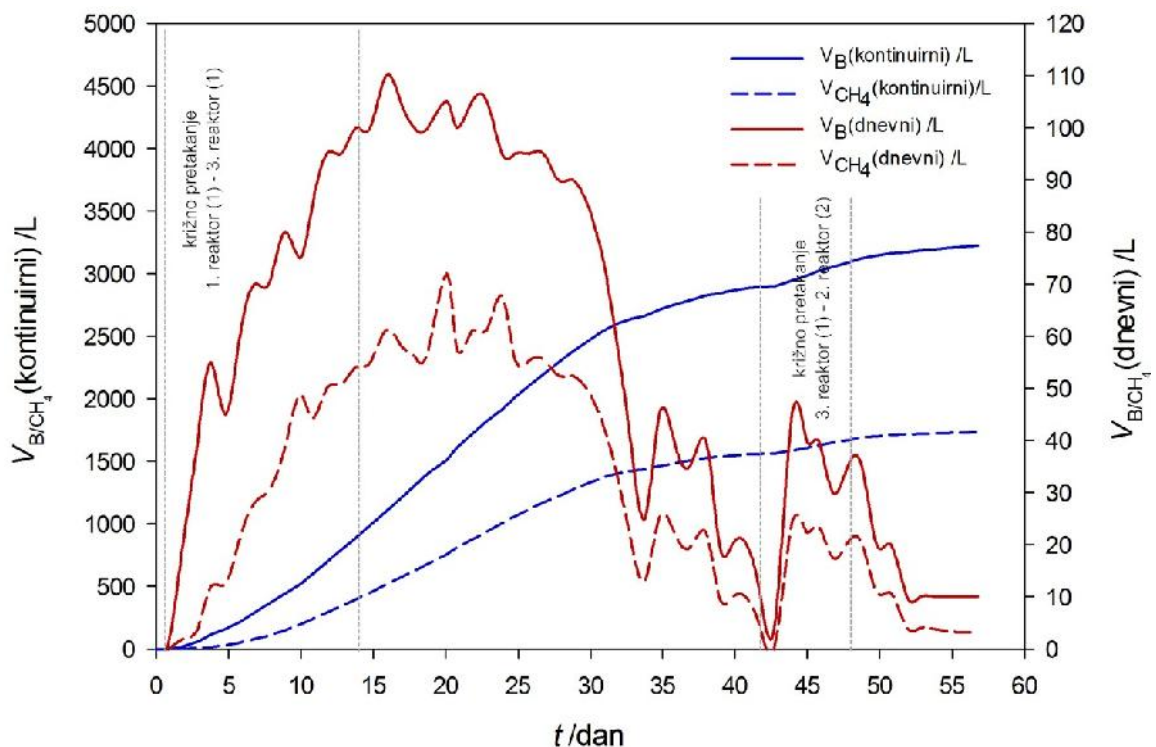
4.2.5 Redukcija OS in celokupna proizvodnja bioplina v reaktorju pilotnega sistema

Ker smo dnevno spremljali volumen nastalega bioplina in sestavo plinov v bioplenu, smo proizvodnjo biometana prera unavali na osnovi dnevnih podatkov analize sestave bioplina. Celokupna proizvodnja biometana tako predstavlja seštevek dnevnih izra unavanj, in sicer znaša 3225,0 L (Tabela 4.11)

Tabela 4.11: Redukcija OS in celokupna proizvodnja bioplina in metana v reaktorju pilotnega sistema.

Reaktor	OS _{red} / (g/kg)	OS _{red} / %	V _B / L	V _{CH₄} / L
3. reaktor (1)	58,2	21,1	3225,0	1732,7

Tako kot pri vsebnosti pH v izcedni vodi in pri sestavi bioplina, se vpliv pretakanja izcedne vode pozna tudi pri proizvodnji bioplina. Dnevna proizvodnja bioplina iz 52 kg nasutega substrata je dosegla tudi 110 L/dan (Slika 4.9). Najvišji nivo dnevne proizvodnje bioplina je bil zabeležen takoj po prekinitvi prvega križnega pretakanja izcedne vode. Po uspešnem zagonu procesa v reaktorju, se je po 14. dneh za ela intenzivna metanogena faza, kar je razvidno iz visoke dnevne proizvodnje bioplina, visokem deležu metana v bioplenu (55 %) in vrednost pH izcedne vode, ki se je ustalila na vrednosti 7. Do 41. dneva procesa, to je do drugega pretoka izcedne vode, je bila proizvodnja bioplina 2900 L in proizvodnja biometana 1560,9 L. Brez drugega pretoka bi se koli ina proizvedenega bioplina le še minimalno pove ala, saj je bila dnevna proizvodnja bioplina 42. dan fermentacije le 5 L. Z uvedenim drugim pretokom izcedne vode se je proizvodnja bioplina ponovno pove ala vse do 45 L/dan.



Slika 4.9: Dnevna in kontinuirana proizvodnja bioplina in metana v reaktorju pilotnega sistema.

4.2.6 Bioplinski in biometanski potencial

V procesu anaerobne fermentacije v trdnem stanju in pri termofilnem temperaturnem režimu je nastalo $V_{CH_4} = 33,32$ L CH_4 /kg substrata, kar predstavlja $BMP = 120,95$ L CH_4 /kg OS pri zadrževalnem času substrata v reaktorju 56 dni. Adhiraki idr. [14] so dosegli s trdno fermentacijo pri termofilnem temperaturnem nivoju ter obtakanju izcedne vode, proizvodnjo metana 143 L/kg OS. Za substrat je bila uporabljena organska frakcija komunalnih odpadkov. Proces je potekal 76 dni. Fernandez idr. [103] so v svoji študiji dosegli proizvodnjo metana 110 L/kg OS. Fermentirali so lo eno zbrano organsko frakcijo komunalnih odpadkov z vsebnostjo SS 20 % pri mezofilnem temperaturnem režimu. Po 30. dneh so Brown idr. [15] s fermentacijo v trdnem stanju in mezofilnem temperaturnem nivoju dosegli naslednje proizvodnje biometana za obravnavane substrate: 123,9 L/kg OS za pšenično slamo, 75,3 L/kg OS za listje, 49,3 L/kg OS za vrtno odpadke (veje in listje), 46,9 L/kg OS za javorjev les in 17 L/kg OS za borov les. Pri primerjavi doseženega rezultata naše študije z dognanji drugih smo ugotovili, da je proizvodnja biometana podobna kot jo navajajo drugi avtorji za organsko frakcijo komunalnih odpadkov, ki predstavlja skupek različnih organskih materialov. Metanski potenciali lesa posameznih lesnih vrst so veliko nižji od potenciala organske frakcije.

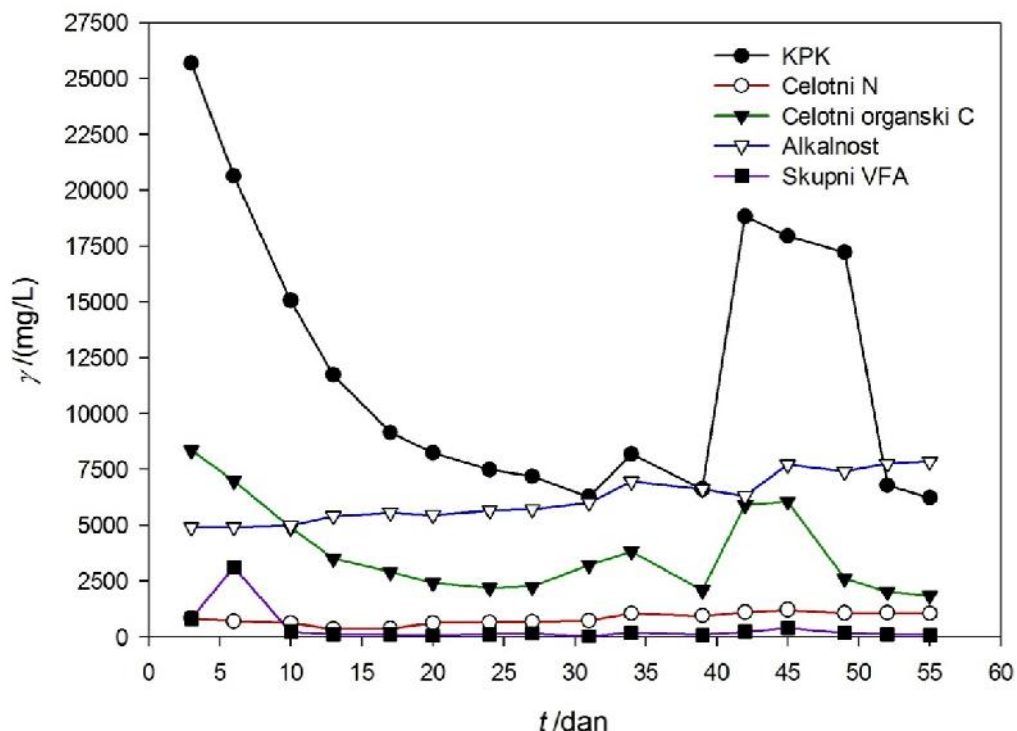
BMP do drugega pretoka izcedne vode je znašal 108,96 L/kg OS, z drugim pretokom se je BMP povečal za 11 % (120,95 L/kg OS).

Tabela 4.12: Bioplinski (BPP) in biometanski potencial (BMP) LB v pilotnem sistemu.

Reaktor	V_B / (L/kg)	V_{CH_4} / (L/kg)	BPP / (L/kg OS)	BMP / (L/kg OS)	do 2. pretoka izcedne vode	
					BPP / (L/kg OS)	BMP / (L/kg OS)
3. reaktor (1)	63,02	33,32	225,11	120,95	202,43	108,96

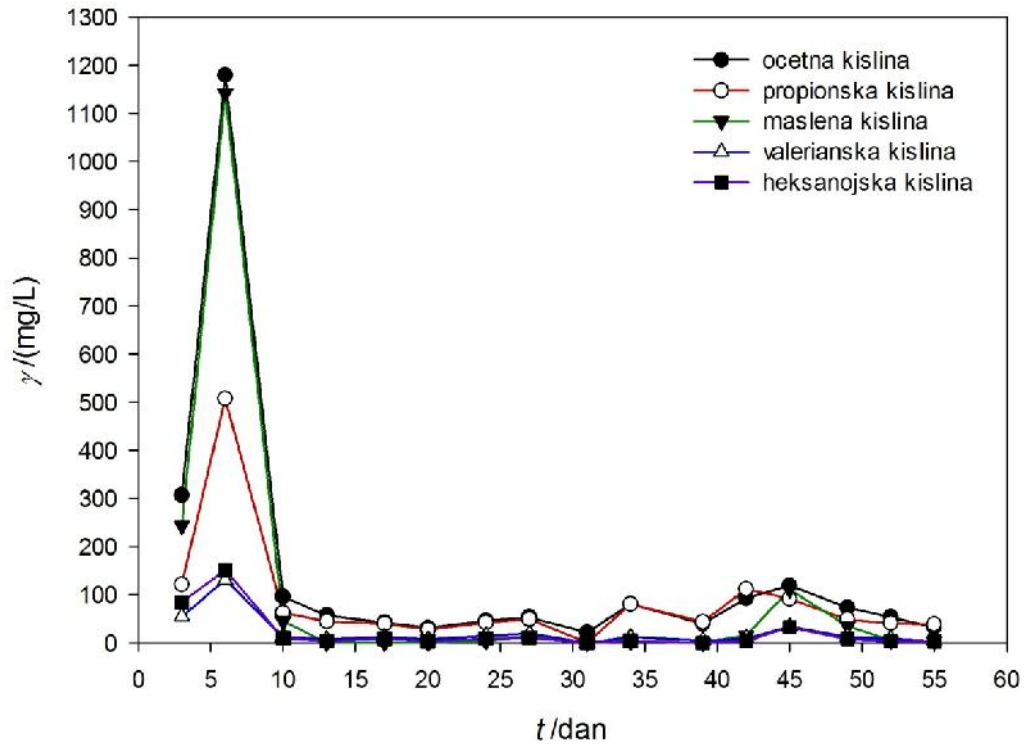
4.2.7 Vsebnost KPK, celotnega dušika, celotnega organskega ogljika, alkalnosti in hlapnih maščobnih kislin v izcedni vodi

Pretakanje izcedne vode ni imelo vpliva na vsebnost dušika v izcedni vodi, kot tudi ne na alkalnost, ki se je konstantno pove evala s časom obratovanja reaktorja, ne glede na pretoke izcedne vode. Vpliv pretakanje izcedne vode je bil viden pri spreminjanju količine hlapnih maščobnih kislin v izcedni vodi v različnih fazah procesa anaerobne fermentacije. V prvi fazi je količina hlapnih maščobnih kislin zelo narasla, kot posledica razpada dolgotrajnih maščobnih kislin. Hiter padec koncentracije hlapnih maščobnih kislin v začetku procesa je eden od znakov stabilnosti procesa. Vsekakor pa k tej stabilnosti pripomore tudi pretakanje izcedne vode. Drugi pretok izcedne vode je le minimalno vplival na spremembo koncentracije hlapnih maščobnih kislin. Podroben pregled koncentracij posameznih hlapnih maščobnih kislin je predstavljen na Sliki 4.11. Največji vpliv pretakanja izcedne vode je viden pri vsebnosti KPK in celotnega organskega ogljika v izcedni vodi. Oba parametra sta merila za vsebnost organske snovi v procesu, oz. raztopljenih enostavnih organskih spojin, ki jih mikroorganizmi najlažje predelajo v bioplin. Glede na potek anaerobne fermentacije, se tako KPK, kot koncentracija celotnega organskega ogljika nižata s podaljševanjem zadrževalnega časa substrata v reaktorju. Padec organske snovi se dogaja simultano z najvišjo dnevno proizvodnjo bioplina in najvišjo vsebnostjo biometana v bioplinu. Vsebnost KPK v izcedni vodi je tudi po zaustavitvi procesa po 56. dneh ostala visoka, in sicer 6220 mg/L. Podobna koncentracija je bila tudi pred drugim pretokom izcedne vode. Iz rezultata sklepamo, da so se v izcedno vodo iz substrata izprale tudi kompleksnejše spojine organskega materiala, ki ga mikroorganizmi niso sposobni predelati v bioplin (Slika 4.10).



Slika 4.10: Vsebnost KPK, dušika, ogljika in alkalnosti v izcedni vodi.

Najvišjo vsebnost med hlapnimi maš obnimi kisljinami dosežeta očetna in maslena kislina v za etni fazi procesa anaerobne fermentacije. Po procesu acidifikacije se je proces popolnoma stabiliziral in pri optimalnem, stabilnem delovanju procesa anaerobne fermentacije, so ostale koncentracije vseh hlapnih maš obnih kisljin nizke do konca procesa, koncentracije so se le minimalno dvignile ob drugem pretoku izcedne vode (Slika 4.11).



Slika 4.11: Vsebnost hlapnih maš obnih kisljin v izcedni vodi.

4.2.8 Kurilna vrednost metana in energetska bilanca pilotnega sistema

Kurilna vrednost proizvedenega metana je nizka v primerjavi s kurilno vrednostjo substrata. Iz primerjave z rezultati iz sistema AMPTS lahko razberemo, da smo iz substratov, na katerih ni rastle goba, pridobili več energije v obliki proizvedenega metana. Za vzorce iz sistema AMPTS smo dobili približno 2 kratno količino proizvedene energije (2,66 in 2,32 MJ/kg_{substrata}) v primerjavi z rezultatom iz pilotne serije poskusov (1,22 MJ/kg_{substrata}) (Tabela 4.13).

Tabela 4.13: Kurilna vrednost in izkoristek vzorca anaerobne fermentacije v trdnem stanju.

Vzorec	$H_c^{\circ} /$ (MJ/kg _{substrata})	$H_c^{\circ} \text{CH}_4 /$ (MJ/kg _{substrata})	$\gamma / \%$
3. reaktor (1)	17,44	1,22	7,00

Pri vseh vzorcih, prerašanih z glivo, je bila kurilna vrednost proizvedenega metana nižja od vrednosti pridobljene iz pilotnega sistema. Predvidevamo, da so razlike v doprinosu kurilne vrednosti posledica različne obremenitve reaktorjev (tekoča, trdna fermentacija), v sistemu AMPTS je bilo vpeljano mehansko mešanje reakcijske brozge in sistem smo zagnali z aktivno anaerobno združbo. Pilotni sistem je deloval brez mehanskega mešanja, anaerobno združbo smo vzdrževali z obtakanjem izcedne vode med reaktorji, v reaktorje ni bila dodana zunanja anaerobna združba. Tudi temperaturni nivo delovanja obeh sistemov je bil različen. Predpostavljamo, da je k višji donosnosti sistema AMPTS prispevala tudi mehanska predobdelava substratov, saj smo vzorce za uporabo v sistemu AMPTS fino zmleli, medtem ko so bili vzorci za pilotni sistem mnogo večji, saj so bili zdrobljeni le z vrtnim drobilnikom. S sistemom AMPTS pridobimo podatke o maksimalni proizvodnji biometana, ki je mogoča za posamezen vzorec. Pilotni sistem posnema obratovanje sistema v industrijskem merilu a v manjšem volumnu.

Pri obratovanju pilotnega sistema smo spremljali porabo električne energije pri obratovanju vrtnega drobilnika, s katerim smo mleli LB, pri obratovanju procesa smo merili porabljenno električno energijo za delovanje električnih grelnih kablov, pretakanja izcedne vode in *on-line* beleženje temperature ter delovanje prenosnega merilnika za analizo vsebnosti plinov.

Za obratovanje reaktorja, katerega delovanje smo podrobno predstavili v prejšnjih razdelkih, smo izračunali celotno porabo električne energije, ki smo jo porabili za delovanje reaktorja v 56. dneh. Celotna poraba energije je znašala 120 kWh. Od tega so največji porabniki električnih grelnih kablov, katerih poraba predstavlja kar 99 % celotne porabe električne energije. Zraven grelnih kablov je bil na električno omrežje neprekinjeno priklopljen še sistem beleženja temperatur v reaktorjih. Črpalke za pretakanje izcedne vode so delovale zgolj 1 min/dan, saj smo pretok izcedne vode vršili enkrat dnevno. Enkrat na dan smo spremljali tudi sestavo bioplina. Porabljenaa električna energija pretvorjena v MJ predstavlja 435 MJ porabljene energije za obratovanje enega reaktorja v sistemu.

Iz rezultatov energetske bilance je razvidno, da deluje reaktor pilotnega sistema z veliko izgubo. Vzrok za to je v viru ogrevanja reaktorja, saj grelni kabli predstavljajo velikega porabnika elektri ne energije. Glavni namen vzpostavitve pilotnega sistema je bila študija možnosti proizvodnje bioplina iz LB in vpliva pretakanja izcedne vode na proizvodnjo bioplina iz LB. Pilotni sistem je bil sestavljen za doseganje optimalne strukture procesa. Na tem nivoju poraba elektri ne energije ni tako pomembna, kot je pri vzpostavitvi anaerobne fermentacije na industrijskem merilu, na katerem se morajo preu iti vsi prenosi toplote, ki jih lahko koristno uporabimo pri na rtovanju procesa, vsekakor pa mora veljati na elo pozitivne energetske bilance, da je proces ekonomsko upravi en (Tabela 4.14).

Tabela 4.14: Energetska bilanca reaktorja iz pilotnega sistema.

	poraba	proizvodnja	razlika
A_{el}/MJ	435	63	-372

Kot smo ugotovili iz rezultatov iz sistema AMPTS, gojenje glive direktno na substrate pri pogojih uporabljenih v naši študiji, z namenom biološke predobdelave, ni prineslo pozitivnih rezultatov na proizvodnjo bioplina. Alternativno direktnemu gojenju glive na LB substratih predstavlja uporaba njihovih encimov z namenom razgradnje kompleksnih spojin organskega materiala pred procesom anaerobne fermentacije, ki vplivajo na boljši izkoristek procesa anaerobne fermentacije LB. Na svetovnem tržiš u dosegaajo encimi visoke cene, zato je nakup encimov za izboljšanje hidrolize v procesu anaerobne fermentacije ekonomsko neupravi en strošek. Iz tega stališ a smo v nadaljevanju naše raziskave sami vzgojili glivo *P. ostreatus*, ekstrahirali encime, jim dolo ili encimske aktivnosti ter v zadnji fazi primerjali u inkovitost razgradnje LB in ostanka po fermentaciji z ekstrahirano mešanico encimov ter z dvema kupljenima komercialnima encimoma. Rezultati eksperimentov, povezanih z gojenjem glive, ekstrakcije encimov, dolo evanje encimskih aktivnosti in encimske hidrolize so predstavljeni v naslednjih razdelkih.

4.3 Rast glive na različnih mešanicah PO in LB

Uporabili smo različne kombinacije PO in LB v gojiščih za gojenje glive *P. ostreatus*. Razmerja med PO in LB v gojiščih so bila naslednja: 80:20 (PO1), 50:50 (PO2), 20:80 (PO3), kjer vrednost 100 pomeni 5 g suhe snovi uporabljene biomase za gojišče. Vsako gojišče smo dobro premešali pred dodatkom rastnega medija.

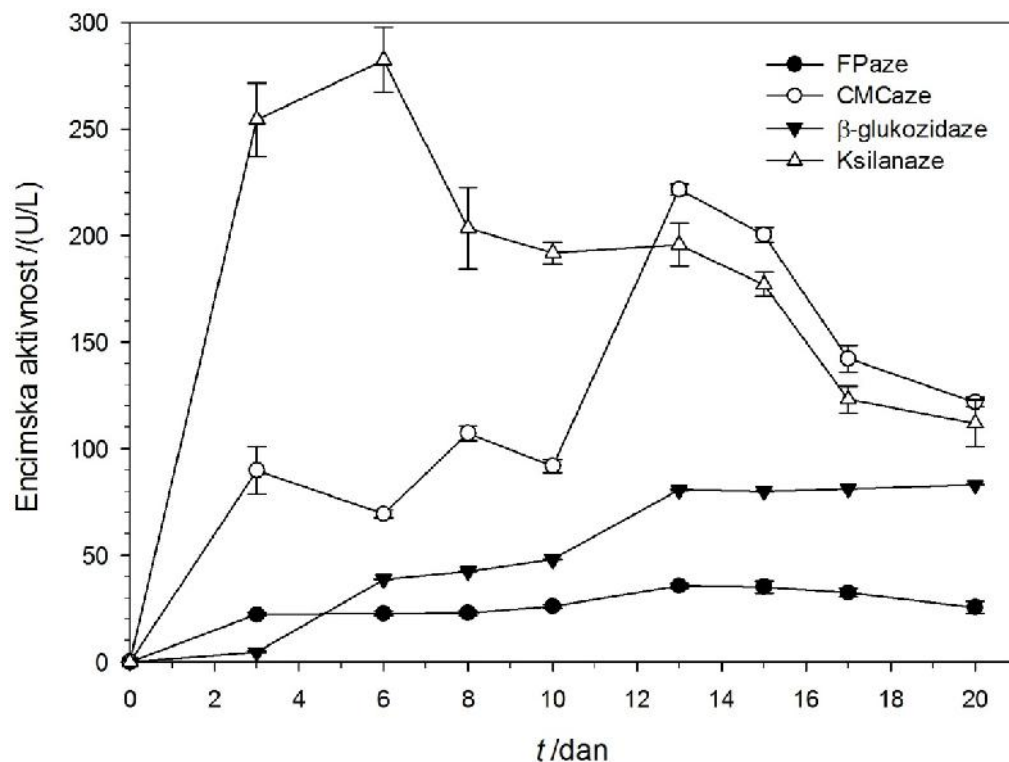
Hitrost rasti glive smo spremljali dnevno vseh 20 dni inkubacije pri stanih pogojih, brez svetlobe pri temperaturi 28 ± 1 °C. Hitrost rasti glive se je razlikovala med gojiščih uporabljenimi v naši študiji. Po inkubaciji gojiščih z vcepki gliv smo zaznali najintenzivnejšo rast micelija po treh dneh na gojiščih u PO1. V nasprotju je bila rast micelija po treh dneh na gojiščih u PO3 komaj zaznavna. V naslednjih dneh je bila rast glive zelo intenzivna, po šestih dneh je že bila pokrita celotna površina PO1 gojiščih a, sedmi dan je bila pokrita površina na gojiščih u PO2 in osmi dan je bila pokrita površina tudi na gojiščih u PO3, ki je vsebovalo najvišji delež LB. V naslednjih dneh je bila zaznana rast micelija tudi v globino gojiščih a, po petnajstih dneh je gliva prerasla celotno gojišče na vseh PO substratih. Med paralelkami posameznega gojiščih a je bila rast micelija zelo skladna. Iz hitrosti rasti micelija smo lahko razbrali, da povečanje deleža LB v gojiščih u ne stimulira rasti micelija glive *P. ostreatus*, kar smo potrdili tudi z analizami encimov iz ekstraktov, saj smo najvišje vrednosti encimskih aktivnosti zabeležili za gojišče PO1, kjer je potekala rast glive najintenzivnejše. Razlike v rasti glive so predstavljene tudi na Sliki 4.12.



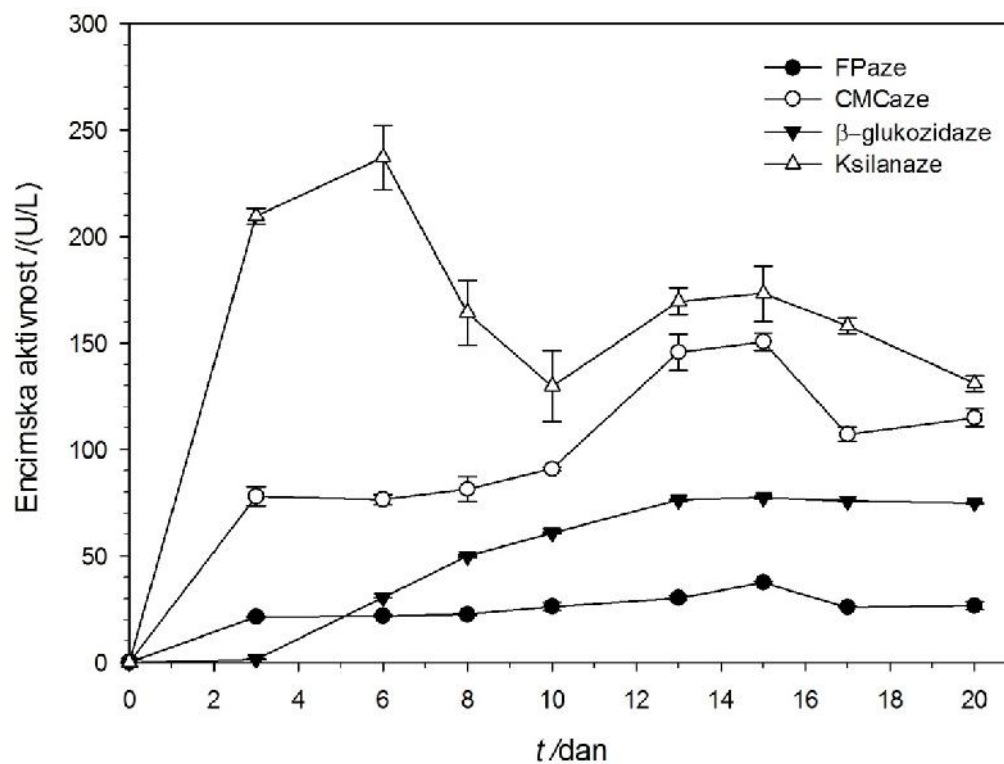
Slika 4.12: Primerjave rasti micelija glive *P. ostreatus* na tretji dan gojenja za substrat z najnižjim deležem LB (a) in z najvišjim deležem LB (b). Slika 4.12 (c) prikazuje hitrost rasti micelija po desetih dneh inkubacije za gojišče PO1.

4.4 Vpliv sestave substrata in inkubacijskega časa na encimske aktivnosti

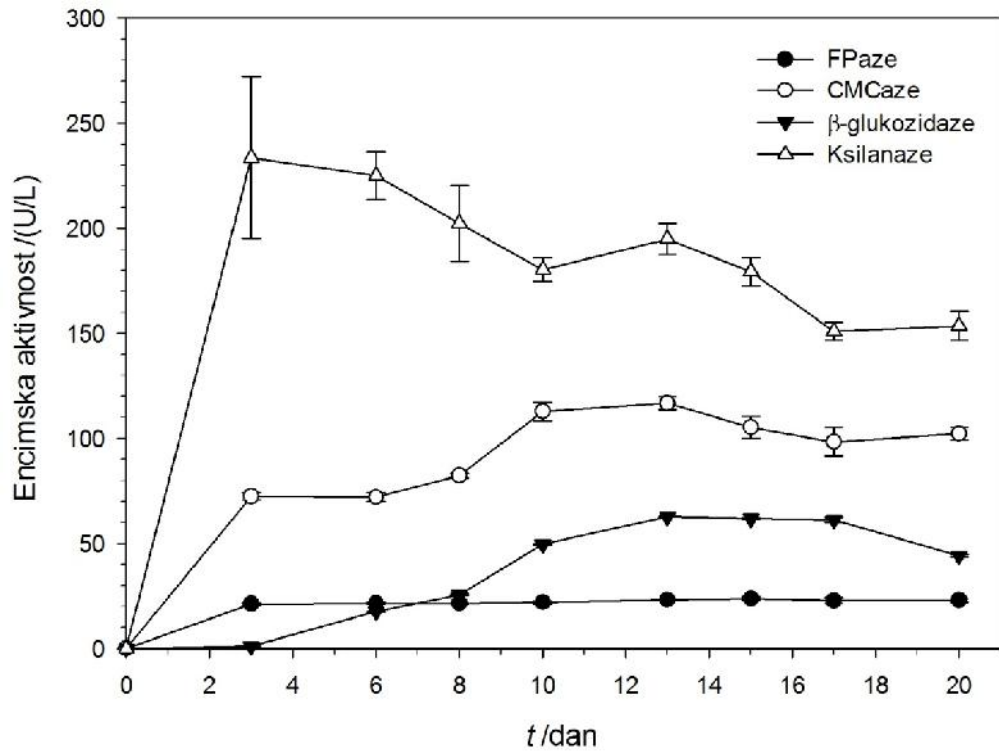
Kot smo sklepali že iz razlik med različnimi hitrostmi rasti micelija pri različnih substratih, smo iz rezultatov encimskih aktivnosti ugotovili razlike tudi pri proizvodnji encimov za različne substrate. Hitrost rasti micelija je bila sorazmerna s proizvodnjo encimov. Najvišje aktivnosti encimov smo namreč zaznali na substratu PO1, kjer je bila rast micelija najintenzivnejša. Slika 4.13, Slika 4.14, Slika 4.15, Slika 4.16, Slika 4.17, Slika 4.18 in Slika 4.19 podajajo vpliv inkubacijskega časa na encimske aktivnosti FPaz, CMCaz, -glukozidaz in ksilanaz za gojišča PO1, PO2 in PO3. Slika 4.20 prikazuje aktivnost lakaz v odvisnosti od časa za gojišča PO1, PO2 in PO3.



Slika 4.13: Encimske aktivnosti FPaz, CMCaz, -glukozidaz in ksilanaz dosežene pri gojenju *P. ostreatus* na PO1 gojiš u.

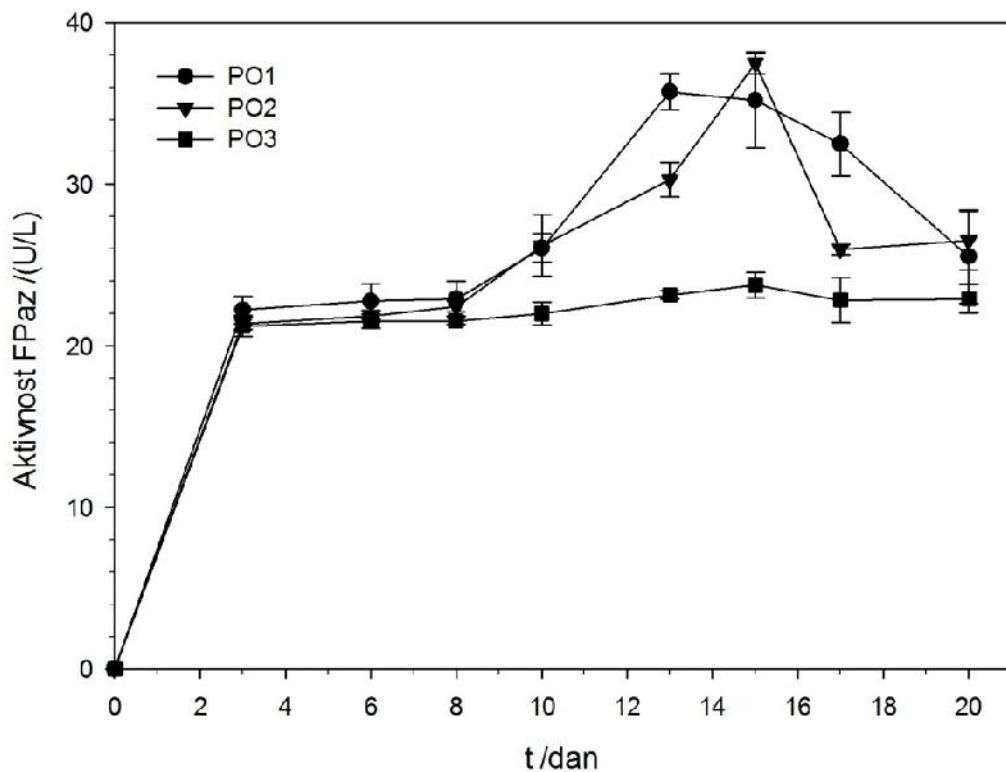


Slika 4.14: Encimske aktivnosti FPaz, CMCaz, -glukozidaz in ksilanaz dosežene pri gojenju *P. ostreatus* na PO2 gojiš u.



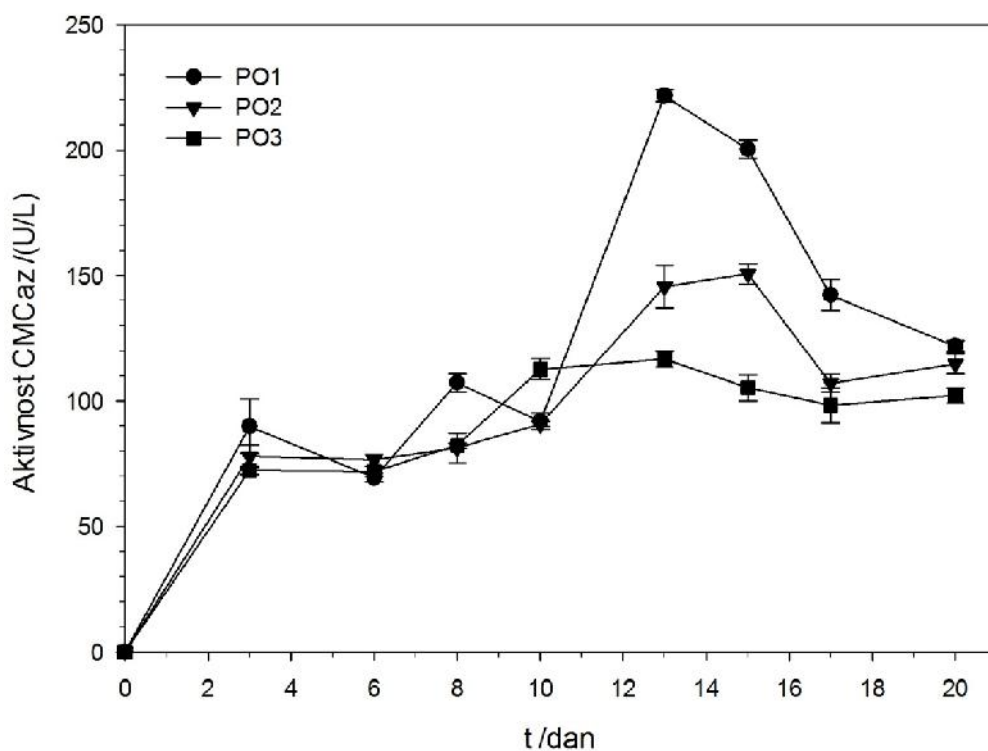
Slika 4.15: Encimske aktivnosti FPaz, CMCaz, β -glukozidaz in ksilanaz dosežene pri gojenju *P. ostreatus* na PO3 gojiš u.

Vrednosti encimskih aktivnosti FPaz so bile nizke za vse tri uporabljene substrate pri gojenju glive *P. ostreatus*. Najvišja dosežena vrednost je bila dosežena 15. dan gojenja pri substratu PO2, ko je bila encimska aktivnost FPaz 37,5 U/L (Slika 4.14 in Slika 4.16).



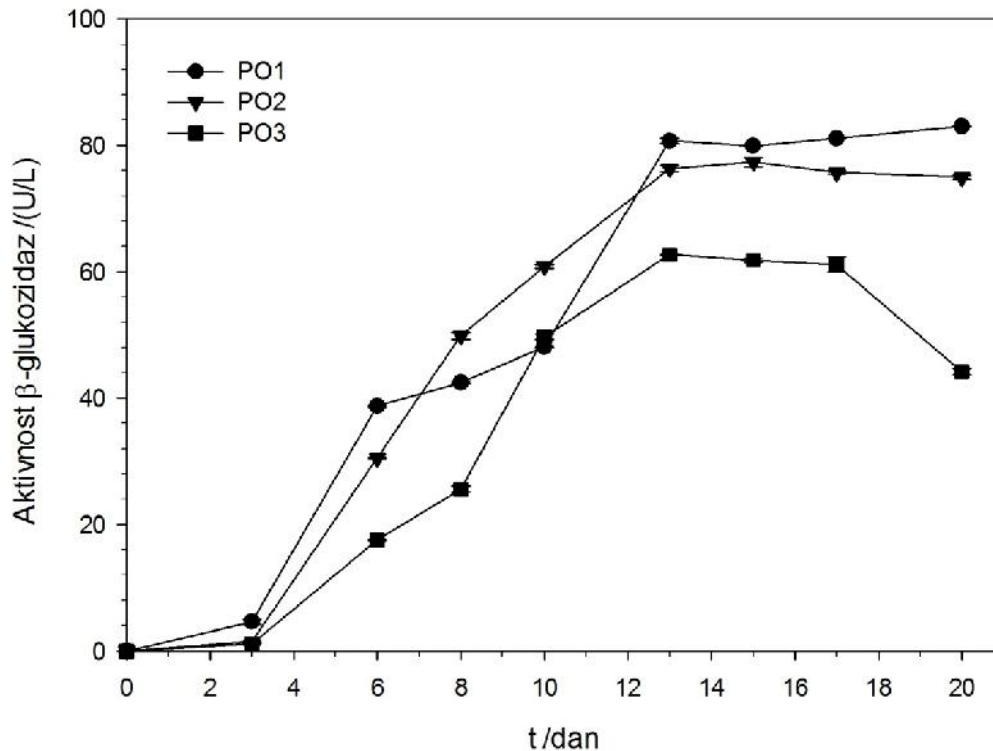
Slika 4.16: Encimske aktivnosti FPaz dosežene pri gojenju *P. ostreatus* na PO1, PO2 in PO3 gojiš ih.

Najvišjo aktivnost CMCaz smo zabeležili na substratu PO1 (Slika 4.13 in Slika 4.17) po 13. dneh gojenja, ko je bila aktivnost 221,7 U/L. Proizvodnja CMCaz se je povečevala z inkubacijskim časom vse do 13. dneva za substrata PO1 (Slika 4.13 in Slika 4.17) in PO3 (Slika 4.15 in Slika 4.17) in do 15. dneva za substrat PO2 (Slika 4.14 in Slika 4.17), ko je aktivnost dosegla najvišjo raven, nato je za vsakega aktivnost z nadaljevanjem inkubacijskega časa padala. Maksimalne vrednosti CMCaz za PO2 (150,7 U/L) in PO3 (116,7 U/L) substrata so bile nižje v primerjavi z doseženo maksimalno aktivnostjo za PO1 substrat.



Slika 4.17: Encimske aktivnosti CMCaz dosežene pri gojenju *P. ostreatus* na PO1, PO2 in PO3 gojiščih.

Aktivnosti α -glukozidaz so se v odvisnosti od inkubacijskega časa obnašale podobno kot aktivnosti CMCaz, vendar na nižji ravni. Najvišjo aktivnost α -glukozidaz smo določili na 20. dan fermentacije pri substratu PO1 (Slika 4.13 in Slika 4.18), in sicer je bila maksimalna vrednost 83,0 U/L. Vrednosti aktivnosti α -glukozidaz pri substratih PO2 in PO3 so bile na nižji ravni v primerjavi z aktivnostmi pri substratu PO1.

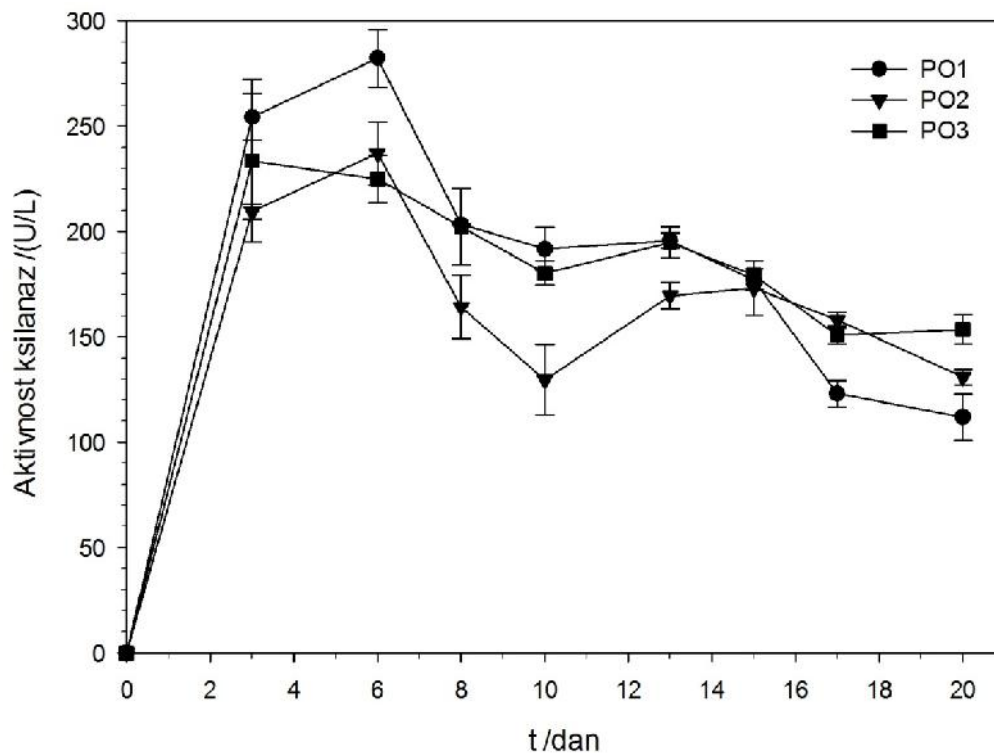


Slika 4.18: Encimske aktivnosti β -glukozidaz dosežene pri gojenju *P. ostreatus* na PO1, PO2 in PO3 gojiših.

Vrednosti aktivnosti celulaz izražene kot FPaze, β -glukozidaze in CMCaze so bile najvišje z uporabo gojiš a PO1, pri katerem smo k PO dodali 20 % LB, kar je najmanjši odstotek dodane LB v primerjavi z gojiš ema PO2 in PO3 (Slika 4.13 do Slika 4.18). Iz rezultatov encimskih aktivnosti celulaz smo zaključili, da povečanje deleža LB v gojiš ih negativno vpliva na proizvodnjo celuliti nih encimov, kar se je odražalo v nižjih encimskih aktivnostih celulaz za gojiš a PO2 in PO3 v primerjavi z gojiš em PO1.

Rana idr. [104] so raziskovali rast gliv in proizvodnjo lignoceluliti nih encimov štirih vrst *Pleurotus*, ki so jih gojili na trdnih gojiš ih, kjer so kot substrat uporabili liste ajevca. Nivo rasti glive je podoben obnašanju rasti micelija v naši raziskavi, gliva je popolnoma prerasla substrat listov ajevca v 8. dneh. V vseh obravnavanih vrstah *Pleurotus* so bile aktivnosti celuliti nih encimov zelo nizke v primerjavi z vrstami *Agaricus*, nasprotno so pri vrstah *Pleurotus* dokazali najvišje aktivnosti lakaz. Kurt in Buyukalaca [105] sta študirala sposobnost proizvodnje lakaz in CMCaz z glivama *P. ostreatus* in *P. sajor-cajo* na razli nih kmetijskih odpadkih na trdnih gojiš ih. Aktivnost lakaz je dosegla najvišjo vrednost 10. dan rasti micelija in aktivnost je bila najvišja na gojiš u, ki je vsebovalo PO in nizko C/N razmerje, v primerjavi z ostalimi gojiš i, ki so vsebovale PO. Zraven tega so bile aktivnosti CMCaz najvišje na gojiš ih, ki so vsebovala PO.

Pri proizvodnji ksilanaz smo zaznali najvišje aktivnosti v zgodnji fazi gojenja glive. Najvišja vrednost na gojiš u PO1 je bila dosežena 6. dan inkubacije z vrednostjo 282,4 U/L (Slika 4.13 in Slika 4.19), na gojiš u PO2 je bila najvišja aktivnost 237,1 U/L (Slika 4.14 in Slika 4.19) prav tako po 6. dneh gojenja glive *P. osteratus*. V primeru uporabljenega PO3 gojiš a, je bila najvišja aktivnost ksilanaz dosežena 3. dan inkubacije, in sicer je bila takrat aktivnost 233,6 U/L (Slika 4.15 in Slika 4.19). Po dosegu maksimalne vrednosti proizvodnje ksilanaz, je le ta po asi padala s podaljševanjem inkubacijskega asa rasti micelija.



Slika 4.19: Encimske aktivnosti ksilanaz dosežene pri gojenju *P. ostreatus* na PO1, PO2 in PO3 gojiš ih.

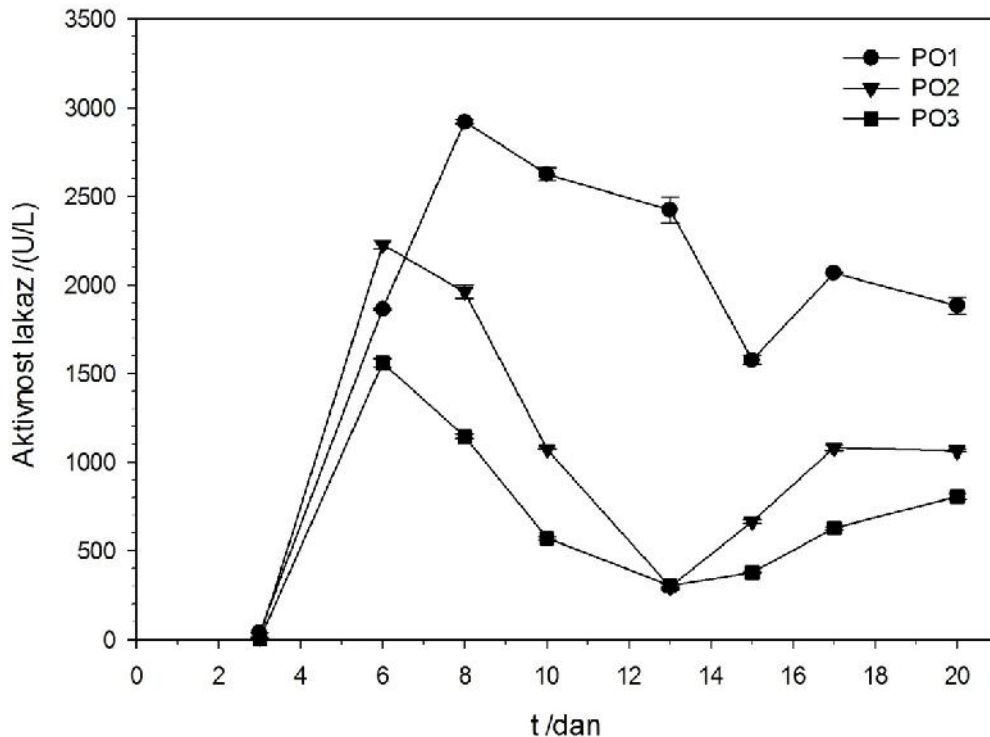
V študijah drugih raziskovalcev se največkrat pojavi proizvodnja ksilanaz z uporabo različnih inducerjev, ki spodbujajo proizvodnjo ksilanaz. Kyu idr. [106] so dokazali, da je lahko proizvodnja ksilanaz povečana z dodatkom kombinacije netopnega ksilana in topnega sladkorja D-arabinoze. Dodatek D-arabinoze k ksilanu so namreč uporabili kot gojišče, s katerim so pridobili visoke aktivnosti ksilanaz. Qinngho idr. [54] so dokazali veliko višje vrednosti aktivnosti ksilanaz (19,98 U/L), kot so bile vrednosti dokazane v naši študiji. Dokazali so, da ima dušik velik vpliv na proizvodnjo ksilanaz. Med različnimi anorganskimi in organskimi viri dušika, je bil pepton najboljši stimulator pri proizvodnji ksilanaz.

Lakaze smo določili z uporabo ABTS kot substrata. Eksperimenti so bili izvedeni brez dodatka bakra, ki velja za sprožitelja spodbujanja proizvodnje lakaz. Donos lakaz glive *P. ostreatus* je v naši študiji močno variiral glede na uporabljeno trdno gojišče. Najvišji nivo proizvodnje lakaz smo določili na gojišču PO1 8. dan inkubacije, ko je bila aktivnost lakaz 2920,0 U/L (Slika 4.20). Takrat je bila celotna površina gojišča pokrita z micelijem in rast micelija se je že širila tudi v globino gojišča. Aktivnosti lakaz na gojiščih PO2 in PO3 so bile nižje, ravno tako pa so bile maksimalne vrednosti dosežene v različnih fazah gojenja *P. ostreatus*. Maksimalna vrednost za PO2 je bila 2226,7 U/L in za PO3 1558,3 U/L (Slika 4.20).

Mirsha in Kumar [101] sta ugotovila, da z ogljikom in dušikom bogate surovine, če so mešane v pravem razmerju, dajejo optimalne pogoje za maksimalno proizvodnjo lakaz brez dodatnih sprožiteljev. Verma in Madamwar [107] poročata, da dajejo lignocelulozni substrati, ki vsebujejo PO, najvišje aktivnosti lakaz in mangan peroksidaz pri uporabi trdnih gojišč. Gupte idr. [108] so raziskovali potencial lignoceluloznih substratov za proizvodnjo ligninolitičnih encimov z gojenjem *Phanerochaete chrysosporium*, *P. ostreatus* in *Trametes versicolor* na trdnih gojiščih. Aktivnost lakaz je bila najvišja pri glivi *P. ostreatus*, in sicer je bila maksimalna aktivnost zabeležena na 8. dan inkubacije, ko se je začela razgradnja

lignina, nato je aktivnost nekoliko padla do konstantnega nivoja, medtem ko je nivo razgradnje lignina ostal konstanten.

Lakaze so bile najbolj izražen encim pri vseh uporabljenih substratih v študiji. Ta rezultat je skladen s splošno ugotovitvijo, da so lakaze zelo razširjene pri glivah bele trohnobe. Predvsem *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* in *Ganoderma lucidum* so dobro raziskane glive bele trohnobe in lakaze so v ve ini primerov predstavljene kot glavni ligninoliti ni encimi pri teh vrstah gliv [109].



Slika 4.20: Encimske aktivnosti lakaz dosežene pri gojenju *P. ostreatus* na PO1, PO2 in PO3 gojiš ih.

Sposobnost proizvodnje lakaz pri razli nih glivah bele trohnobe in na razli nih substratih je bila že obravnavana v mnogih študijah. Zaradi visoke katalitske u inkovitosti in širokih oksidativnih zmogljivosti so postale lakaze atraktivni, industrijsko pomembni encimi, ki so sposobni delignifikacije lesne pulpe, razbarvanja in detoksikacije odpadnih voda papirne industrije, razgradnje toksi nih onesnaževalcev okolja in sinteti nih barvil, ki so karcinogena in nevarna za okolje [110], [111].

Qi-he idr. [112] so raziskovali vpliv hkratne inkubacije dveh vrst gliv bele trohnobe na proizvodnjo encimov, ki razgrajujejo lignin. Hkratna inkubacija *Dichomitus squalens* s *P. ostreatus* stimulira proizvodnjo lakaz v primerjavi s proizvodnjo lakaz pri gojenju monokultur. Pri ve ini gojenj, tako kombinacij kot tudi monokultur, so dolo ili najvišje vrednosti proizvodnje lakaz v za etni fazi gojenja gliv.

Iz pridobljenih rezultatov aktivnosti lakaz v naši študiji lahko zaklju imo, da je proizvodnja lakaz mo no odvisna od sestave gojiš a. Vrednosti aktivnosti lakaz so padale s pove anim deležem LB v gojiš u, kar pomeni, da je dodatek LB v manjši koli ini stimulativen za proizvodnjo lakaz, medtem ko ve ji delež LB v gojiš u ne izzove proizvodnje lakaz.

PO zagotavljajo višjim glivam okolje, ki je podobno njihovemu naravnemu habitatu, ki spodbuja rast micelija in verjetno stimulira izlo anje encimov, ki razgrajujejo lignin [113].

PO so poceni in premalo izkorišeni kmetijski stranski produkt. Beaugrand idr. [114] ter Maes in Delcour [115] so karakterizirali kemijsko sestavo PO, in sicer so sestavljeni iz 30 % hemiceluloze, 10 – 15 % celuloze, 10 – 20 % škroba, 15 – 22 % proteinov in 4 – 8 % lignina ter sledi komponent kot so kutin in lipidi. Predhodne študije so pokazale, da vsebujejo PO optimalno razmerje hranil, ki spodbujajo rast mnogih organizmov [116], [117].

4.5 Optimizacija proizvodnje lakaz glive *P. ostreatus* z uporabo Taguchi metode

4.5.1 Vpliv parametrov na aktivnost lakaz

Sestava substrata in sestava ter koncentracije posameznih komponent v rastnem mediju so ključnega pomena pri fermentaciji v trdnem stanju za proizvodnjo lakaz glive *P. ostreatus*. Preliminarna študija gojenja *P. ostreatus* na različnih gojiščih je pokazala najvišje vrednosti aktivnosti lakaz na gojišču, ki je vseboval 80 % PO in 20 % LB. Zraven tega so rezultati pokazali najvišjo aktivnost lakaz 8. dan gojenja, ko je bila celotna površina gojišča pokrita z micelijem glive. Aktivnost lakaz je povezana z rastjo micelija, aktivnost se povečuje z rastjo micelija, doseže vrh pri maksimalni rasti micelija in nato hitro pade [104]. Statistično optimizacijo faktorjev fermentacije v trdnem stanju za maksimiranje proizvodnje lakaz smo izvedli z uporabo osmih fermentacijskih faktorjev na izbranih nivojih (Tabela 3.2), ki so bili izbrani na osnovi preliminarne študije. Za oceno vpliva procesnih parametrov na proizvodnjo lakaz v fermentaciji v trdnem stanju, smo izvedli eksperimente z uporabo Taguchi L18 ortogonalne matrike. Eksperimenti so pokazali precejšnja nihanja v aktivnosti lakaz pri različnih eksperimentalnih pogojih (Tabela 4.15). Glavni vplivi izbranih faktorjev in dodeljenih nivojih na proizvodnjo lakaz so prikazani v Tabeli 4.16. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ kaže največji vpliv na nivoju 1, medtem ko imajo pH, glukoza, $MnSO_4 \cdot H_2O$ največji vpliv na nivoju 2. Na nivoju 3 je največji vpliv izražen z LB, kvasnim ekstraktom, peptonom in KH_2PO_4 . Najvišji vpliv med vsemi obravnavanimi faktorji kaže LB na nivoju 3, to je pri vsebnosti 20 % LB v gojišču s PO. Lignin je ključni faktor, ki lahko vpliva na razlike pri aktivnostih lakaz. Tinoco idr. [118] so ugotovili, da ima dodatek lignina v gojišču močan pozitiven vpliv na proizvodnjo lakaz glive *P. ostreatus*. Pridobljeni rezultati kažejo, da je aktivnost lakaz višja pri pH 6 kot pri pH 5 (Tabela 4.16), kar so potrdili tudi Mikiashvili idr. [119] in Periasamy idr. [120], ki so dosegli maksimalno proizvodnjo lakaz s pH 6 gojitvenega medija. pH vrednost je ena od glavnih operacijskih parametrov, ki vpliva precej močno na metabolne aktivnosti organizmov [121]. Moharid idr. [122] poročajo o močni induktivnosti dodanih pšeninih otrobov h gojitvenemu mediju, ki vplivajo na povišanje aktivnosti lakaz. Kmetijski odpadni materiali, ki so v glavnem sestavljeni iz lignina, celuloze in hemiceluloze, služijo kot glavni vir ogljika in energije za gojenje gliv iz rodu *Pleurotus* [123]. Maksimalna aktivnost lakaz je dosegla vrednost $26,00 \pm 0,98$ U/g suhe snovi (U/g SS) v eksperimentu številka 17, kot je prikazano v Tabeli 4.15.

Najnižja vrednost aktivnosti lakaz je dosežena na gojišču 1, in sicer je bila aktivnost lakaz za to gojišče 10,90 U/g SS, najvišja vrednost, 26,00 U/g SS, pa je bila dosežena na gojišču 17. Razlika med najnižjo in najvišjo vrednostjo aktivnosti lakaz je velika, kar nakazuje na to, da je sestava gojišča in rastnega medija zelo pomembna pri gojenju gliv za proizvodnjo encimov (Tabela 4.15).

Tabela 4.15: Eksperimentalni načrt z uporabo Taguchi L18 ortogonalne matrike z rezultati aktivnosti lakaz.

Št. eksperimenta	1	2	3	4	5	6	7	8	Aktivnost lakaz/ (U/g SS)
	Faktorji								
1	1	1	1	1	1	1	1	1	10,90 ± 0,36
2	1	1	2	2	2	2	2	2	17,79 ± 0,44
3	1	1	3	3	3	3	3	3	16,49 ± 1,39
4	1	2	1	1	2	2	3	3	12,47 ± 1,86
5	1	2	2	2	3	3	1	1	19,42 ± 0,14
6	1	2	3	3	1	1	2	2	14,66 ± 0,76
7	1	3	1	2	1	3	2	3	20,21 ± 0,72
8	1	3	2	3	2	1	3	1	24,98 ± 0,63
9	1	3	3	1	3	2	1	2	21,80 ± 0,80
10	2	1	1	3	3	2	2	1	17,23 ± 0,26
11	2	1	2	1	1	3	3	2	18,38 ± 0,36
12	2	1	3	2	2	1	1	3	16,35 ± 1,39
13	2	2	1	2	3	1	3	2	16,39 ± 0,41
14	2	2	2	3	1	2	1	3	20,95 ± 1,86
15	2	2	3	1	2	3	2	1	14,01 ± 1,86
16	2	3	1	3	2	3	1	2	24,73 ± 0,68
17	2	3	2	1	3	1	2	3	26,00 ± 0,98
18	2	3	3	2	1	2	3	1	20,06 ± 1,22

Razlika med nivojem 1 in nivojem 2 (N1 –N2) vsakega faktorja podaja relativni vpliv na produkt. Veja kot je razlika, monejši je vpliv. Razlika med nivojem 1 in nivojem 2 je predstavljena v Tabeli 4.16.

Med obravnavanimi faktorji je glukoza pokazala najmonejši vpliv (N2 –N1) v primerjavi z ostalimi faktorji. Povišanje vrednosti faktorjev kot so pH, LB, kvasni ekstrakt, pepton in KH₂PO₄ vplivajo na povečano proizvodnjo encima. V primeru glukoze in MnSO₄·H₂O je bil donos lakaz najvišji pri vrednostih na nivoju 2, naknadno povečanje vrednosti na nivoju 3 zmanjša donosnost lakaz. V primeru MgSO₄·7H₂O je donos lakaz najvišji pri vrednosti na nivoju 1, povečanje vrednosti na nivoju 2 in 3 je imelo za posledico nižjo donosnost lakaz.

Tabela 4.16: Tabela srednjih vrednosti (“Ve je je boljše”).

Zap. št.	Faktorji	Nivo 1	Nivo 2	Nivo 3	Mesto	N2 – N1
1	pH	17.64	19.34		5	1.70
2	LB/(%)	16.19	16.31	22.96	1	0.12
3	glukoza/(g/L)	16.99	21.25	17.23	2	4.26
4	kvasni ekstrakt/(g/L)	17.26	18.37	19.84	3	1.11
5	pepton/(g/L)	17.52	18.39	19.55	4	0.87
6	KH ₂ PO ₄ /(g/L)	18.21	18.38	18.88	8	0.17
7	MgSO ₄ ·7H ₂ O/(g/L)	19.02	18.32	18.13	7	- 0.70
8	MnSO ₄ ·H ₂ O/(g/L)	17.77	18.96	18.74	6	1.19

4.5.2 Analiza variance (ANOVA)

Prispevek posameznih faktorjev je klju nega pomena za kontrolo izboljšanja proizvodnje lakaz v fermentaciji v trdnem stanju. Za tak pristop smo uporabili ANOVO za analiziranje rezultatov eksperimenta izvedenega po ortogonalni matriki in za dolo itev variacije glede na vsak faktor.

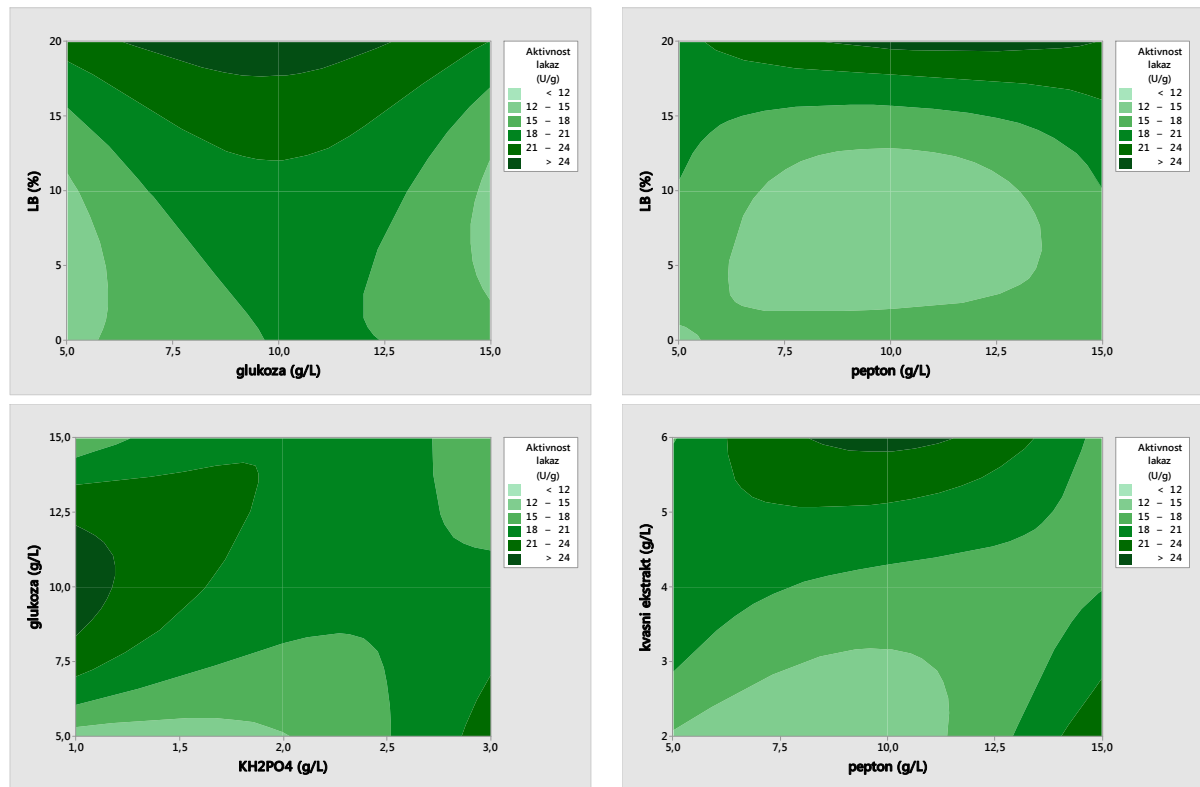
Za rezultate dobljene z ANOVO, z odstotki prispevka posameznega faktorja, smo izvedli analizo z zna ilnostjo = 0,05 (stopnja zaupanja 95 %). e je bila P – vrednost višja od 0,05 je bil prispevek tega faktorja nepomemben ali zanemarljiv. Rezultati kažejo, da so imeli KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O in MnSO₄·H₂O zanemarljiv u inek na proizvodnjo lakaz.

Odstotek prispevka smo izra unali za vsak posamezen faktor z razmerjem iste vsote in skupne vsote kvadratov. Najvplivnejši faktor je bila LB z 59,24 % vseh varianc v eksperimentu, temu je sledila glukoza (22,61 %), kvasni ekstrakt (6,58 %), pH (4,30 %), pepton (4,10 %), MnSO₄·H₂O (1,59 %), MgSO₄·7H₂O (0,87 %) in KH₂PO₄ (0,47 %). Kot je razvidno iz rezultatov, imata LB in glukoza glavni prispevek pri proizvodnji lakaz v primerjavi z drugimi faktorji vklju enimi v eksperimentu. Ob tem lahko iz rezultatov razberemo tudi, da imajo MnSO₄·H₂O, MgSO₄·7H₂O in KH₂PO₄ najnižji prispevek pri proizvodnji lakaz, kar pa je skladno tudi s P-vrednostmi in dokazuje njihov zanemarljiv vpliv na proizvodnjo lakaz. Proizvodnja lakaz glive *P. ostreatus* je mo no odvisna od virov ogljika in dušika. Drugi dejavniki, o katerih so poro ali v literaturi, ki vplivajo na povišano proizvodnjo lakaz v fermentaciji v trdnem stanju so še kvasni ekstrakt, bakrov sulfat in ferulna kislina pri uporabi sladkornega trsa kot substrata za gojiš e [124] (Tabela 4.17).

Tabela 4.17: Analiza variance srednjih vrednosti (ANOVA)

Faktorji	DF	Adj. SS	Adj. MS	F-vrednost	P-vrednost	Prispevek/(%)
pH	1	13,066	13,0662	34,20	0,028	4,30
LB/%	2	180,159	90,0795	235,76	0,004	59,24
glukoza/(g/L)	2	68,773	34,3864	90,00	0,011	22,61
kvasni ekstrakt/(g/L)	2	20,010	10,0051	26,19	0,037	6,58
pepton/(g/L)	2	12,458	6,2289	16,30	0,058	4,10
KH ₂ PO ₄ /(g/L)	2	1,435	0,7175	1,88	0,347	0,47
MgSO ₄ ·7H ₂ O/(g/L)	2	2,633	1,3166	3,45	0,225	0,87
MnSO ₄ ·H ₂ O/(g/L)	2	4,831	2,4155	6,32	0,137	1,59
Napaka	2	0,764	0,3821			0,25
Skupno	17	304,129				

Slika 4.21 prikazuje plastne diagrame, ki prikazujejo vpliv interakcije dveh faktorjev na aktivnosti lakaz. Izmed vseh možnih kombinacij faktorjev so predstavljeni plastni diagrami 4 medsebojnih interakcij dveh faktorjev, ki so pokazali največji vpliv na aktivnost lakaz. Predstavljene so interakcije med LB in glukozo, LB in peptonom, kvasnim ekstraktom in peptonom ter glukozo in KH₂PO₄ in njihov vpliv na proizvodnjo lakaz. 2D plastni diagrami predstavljajo medsebojne povezave med dvema testiranima spremenljivkama in odnos med odzivi in eksperimentalnimi nivoji posamezne spremenljivke. Različne oblike plastnih diagramov prikazujejo različne interakcije med dvema spremenljivkama, temnejša zelena področja prikazujejo višje aktivnosti lakaz. Vpliv LB in glukoze na aktivnost lakaz prikazuje Slika 4.21 a. Iz slike je razvidno, da je dosegla aktivnost lakaz najvišjo vrednost pri $c(\text{glukoza}) = 10 \text{ g/L}$ in 20 % vsebnosti LB v gojišču. To je v skladu z optimalnimi pogoji za proizvodnjo lakaz, ki so predstavljeni v Tabeli 4.18, iz katere je razvidno, da ima največji vpliv na proizvodnjo lakaz LB na nivoju 3 (20 %), sledi ji glukoza na nivoju 2 (10 g/L). Slika 4.21 b predstavlja interakcije med LB in peptonom in kaže najvišji odziv na aktivnost lakaz pri 20 % LB in $c(\text{pepton}) = 12,5 \text{ g/L}$. Prav tako glukoza in KH₂PO₄ vsaka za sebe kažeta nizek prispevek k aktivnostim lakaz, Slika 4.21 c prikazuje interakcije med glukozo in KH₂PO₄, ki kaže visoko aktivnost lakaz pri $c(\text{glukoze}) = 10 \text{ g/L}$ in $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 1 \text{ g/L}$. Tudi interakcija med kvasnim ekstraktom ($c = 6 \text{ g/L}$) in peptonom ($c = 10 \text{ g/L}$) kaže visoke aktivnosti lakaz na Sliki 4.17 d, kljub temu da je prispevek vsakega posameznega faktorja nizek na proizvodnjo lakaz.



Slika 4.21: Plastni diagrami interaktivnih interakcij, ki vplivajo na aktivnost lakaz za LB in glukozo (a), LB in pepton (b), glukozo in KH_2PO_4 (c) in kvasni ekstrakt in pepton (d).

4.5.3 Potrditveni test

Za potrditev pri akovanega rezultata smo opravili potrditveni test (Tabela 4.18) s Taguchi metodo. Izvedli smo fermentacijo *P. ostreatus* v trdnem stanju pri kombinaciji faktorjev na nivojih, ki so bili opredeljeni kot optimalni pogoji za proizvodnjo lakaz.

Tabela 4.18: Optimalni pogoji za proizvodnjo lakaz in njihov prispevek

Zap. št.	Faktorji	Vrednosti	Nivo	Prispevek
1	pH	6	2	0,85
2	LB/%	20	3	4,47
3	glukoza/(g/L)	10	2	2,76
4	kvasni ekstrakt/(g/L)	6	3	1,35
5	pepton/(g/L)	15	3	1,06
6	KH_2PO_4 /(g/L)	3	3	0,39
7	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	0.5	1	0,53
8	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	0.1	2	0,47

Celoten prispevek vseh faktorjev = 11,88; Trenutno veliko povpre je = 18,49; Pri akovani rezultat pri optimalnih pogojih = 30,37

Po 8. dneh inkubacije, smo fermentacijo prekinili z ekstrakcijo encimov, vzorcem smo dolo ili lakazno aktivnost. Napovedana vrednost za aktivnost lakaz z uporabo programa

Minitab 17 je bila 30,37 U/g SS. Tabela 4.19 prikazuje primerjavo med napovedano vrednostjo aktivnosti lakaz pri optimalnih pogojih in aktivnostjo lakaz pridobljeno z eksperimentom izvedenim pri optimalnih pogojih.

Tabela 4.19: Rezultati potrditvenega eksperimenta.

	Predvidena vrednost	Eksperimentalna vrednost	Odstotni odmik/%
Optimalni nivo	A ₂ B ₃ C ₂ D ₃ E ₃ F ₃ G ₁ H ₂	A ₂ B ₃ C ₂ D ₃ E ₃ F ₃ G ₁ H ₂	
Aktivnost lakaz/ (U/L)	30,37	29,15	4,02

Aktivnost lakaz po izvedenem eksperimentu je bila 29,15 U/g SS, ta vrednost je znotraj 95 % stopnje zanesljivosti in tako v korelaciji z napovedanim rezultatom. Membrillo idr. [125] so poročali o maksimalni aktivnosti lakaz 0,04 U/g SS 8. dan gojenja glive *P. ostreatus* IE8 s fermentacijo v trdnem stanju sladkornega trsa z dodatkom amonijevega sulfida. Najvišjo raven aktivnosti lakaz, ki je znašala 15 U/g SS so dosegli tretji do četrti dan fermentacije v trdnem stanju paradižnikove drozge, na kateri so gojili *P. ostreatus* [126]. Isikhuemhen in Mikiashvili [6] poročata o aktivnosti lakaz 164,6 U/g pri gojenju *P. ostreatus* MBFBL400 s fermentacijo v trdnem stanju na gojišču iz pšenične same, trdnih odpadkov anaerobne presnove in stelje. Rezultati pridobljeni v našem eksperimentu so skladni z ugotovitvami Stajina idr. [127], ki so zabeležili najvišjo raven lakazne aktivnosti pri fermentaciji v trdnem stanju na gojišču žagovine iz vinske trte po 10. dneh kultivacije *P. ostreatus* 493, in sicer so dosegli aktivnost lakaz $2144,6 \pm 57,8$ U/L.

4.6 Encimska hidroliza LB in ostanka po fermentaciji

Primernost uporabe LB kot substrata v mnogih industrijah, vključno s proizvodnjo bioplina, je odvisna od uspešne predobdelave. Pri encimski hidrolizi LB so pomembne ligninaze in celulaze. Alternativa komercialnim encimom je domača proizvodnja encimov, ki jih lahko pridobimo z vrsto organizmov, ki rastejo na lesnih in kmetijskih stranskih produktih. Encimi, ki smo jih uporabili v našem eksperimentu, so bili pridobljeni z gojenjem glive *P. ostreatus*. Za encimsko hidrolizo smo uporabili encime, ki smo jih ekstrahirali 8., 10., in 13. dan gojenja glive, saj so bile aktivnosti lakaz v teh dneh na najvišji ravni. Ekstrakti so bili odvzeti iz gojišča, ki je vsebovalo 20 % LB in 80 % PO, saj so bile vrednosti encimskih aktivnosti najvišje pri tem gojišču. Za ovrednotenje uspešnosti hidrolize z encimskih ekstraktom, smo za encimsko hidrolizo uporabili še dva komercialna encima, in sicer Celluclast® 1.5L (celulaze glive *Trichoderma reesei*, Sigma Aldrich) in Viscozyme® L (mešanica celulitičnih encimov gliv rodu *Aspergillus*, Sigma Aldrich). Specifične encimske aktivnosti uporabljenih encimov so predstavljene v Tabeli 4.20. Za objektivno primerjavo učinkovitosti encimske hidrolize, smo vse encime redili na enako vsebnost proteinov. Predpostavili smo, da količina proteinov v raztopinah predstavlja količino prisotnih encimov. Komercialna encima smo redili s $c = 50$ mM citratnim pufram (pH 4,8). Pripravljene raztopine encimov za test encimske hidrolize so tako vsebovale $0,27 \pm 0,02$ mg/mL proteinov.

Pripravljenim raztopinam encimov smo določili vsebnost FPaz, CMCaz, α -glukozidaz, ksilanaz in lakaz. Iz Tabele 4.20 je razvidno, da je vsebnost FPaz in ksilanaz najvišja za Celluclast® 1.5L ($1,56 \pm 0,05$ in $3,93 \pm 0,23$ U/mg proteinov), medtem ko je vsebnost CMCaz in α -glukozidaz najvišja za Viscozyme® L ($1,56 \pm 0,20$ in $0,44 \pm 0,10$ U/mg proteinov). Encimski ekstrakt *P. ostreatus* je vseboval lakaze, medtem ko komercialna encima nista vsebovala lakaz. Specifične aktivnosti FPaz, CMCaz, α -glukozidaz in ksilanaz za encimski ekstrakt so bile nizke v primerjavi z aktivnostmi komercialnih encimov in v primerjavi z aktivnostjo lakaz v ekstraktu.

Tabela 4.20: Specifične aktivnosti encimov, uporabljenih za test encimske hidrolize.

encimi	Specifična aktivnost / (U/mg proteinov)				
	FPaze	CMCaze	α -glukozidaze	Ksilanaze	Lakaze
ekstrakt <i>P. ostreatus</i>	$0,11 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,13$	$0,20 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,07$	$9,36 \pm 0,29$
Celluclast® 1.5L	$1,56 \pm 0,05$	$1,51 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,04$	$3,93 \pm 0,23$	0
Viscozyme® L	$0,43 \pm 0,10$	$1,56 \pm 0,20$	$0,44 \pm 0,10$	$1,53 \pm 0,17$	0

Vrednosti predstavljajo povprečne vrednosti treh eksperimentov.

V nadaljevanju smo encimske raztopine uporabili pri encimski hidrolizi LB in trdnega ostanka po anaerobni fermentaciji. Vzorce smo pred testom zmleli v fine delce, manjše od 1 mm. Za primerjavo učinkovitosti encimske hidrolize smo uporabili še mikro kristalinično celulozo (Avicel® PH – 101, Sigma Aldrich). Uspešnost encimske hidrolize smo ovrednotili z vsebnostjo glukoze v raztopinah po končanem testu hidrolize.

Analiza encimske hidrolize LB prikazuje nizko vsebnost glukoze z uporabljenimi komercialnimi encimi Celluclast® 1.5L, medtem ko je vsebnost glukoze pri uporabljenem Viscozyme® L mnogo višja in primerljiva z vsebnostjo glukoze pri uporabljenem encimskem ekstraktu. Vsebnost glukoze pri uporabljenem encimskem ekstraktu ($2,122 \pm 0,039$ g/L) je za 12 % nižja v primerjavi z vsebnostjo glukoze za uporabljen Viscozyme® L ($2,411 \pm 0,048$) (Tabela 4.21).

Tabela 4.21: Vsebnost glukoze po encimski hidrolizi.

Substrat/ Encim	vsebnost glukoze /(g/L)		
	Celluclast® 1.5L	Viscozyme® L	encimski ekstrakt
LB	$0,924 \pm 0,032$	$2,411 \pm 0,048$	$2,122 \pm 0,039$
ostanek po fermentaciji	$0,068 \pm 0,009$	$0,033 \pm 0,007$	$0,192 \pm 0,017$
Avicel® PH - 101	$4,201 \pm 0,053$	$2,147 \pm 0,061$	$1,862 \pm 0,029$

Ostanek po anaerobni fermentaciji predstavlja biomasa, kjer so bili lahko razgradljivi polisaharidi porabljeni med procesom fermentacije. Tako so bile v ostanku prisotne le še težko razgradljive spojine, ki jih mikroorganizmi niso bili sposobni razgraditi med procesom anaerobne fermentacije. Rezultati encimske hidrolize ostanka po fermentaciji kažejo nizko vsebnost glukoze pri vseh uporabljenih encimih v primerjavi z vsebnostjo glukoze pri razgradnji LB. Kakorkoli, med rezultati encimske hidrolize ostanka po fermentacije, je bil najboljši rezultat dosežen z encimsko hidrolizo encimskega ekstrakta *P. osteratus* (Tabela 4.21).

U inkovitost encimske hidrolize ostanka po fermentaciji s Celluclast® 1.5L je bila 65 % nižja in z Viscozyme® L je bila kar za 83 % nižja od u inkovitosti z encimskim ekstraktom. Potencialna razlaga za tak rezultat je najverjetneje v sestavi encimskih mešanic, uporabljenih v testu encimske hidrolize. Encimski ekstrakt je vseboval lakaze, medtem ko komercialna encima nista vsebovala lakaz. Lakaze katalizirajo oksidacije različnih aromatskih in ne-aromatskih spojin, vključno z ligninom, ki je znan kot obstojna, težko razgradljiva spojina, ki je mikroorganizmi pri anaerobni fermentaciji niso sposobni razgraditi. Ob analiziranih encimih so v raztopinah najverjetneje še tudi drugi encimi, ki jih v naši študiji nismo določili, vendar tudi ti vplivajo na potek encimske hidrolize. Najboljši rezultat pri encimski hidrolizi mikrokristalini ne celuloze smo dosegli z uporabo encimov Celluclast® 1.5L, ki vsebujejo celulaze glive *Trichoderma reesei*. Najnižjo vrednost glukoze smo določili v vzorcu, kjer smo pri encimski hidrolizi uporabili encimski ekstrakt (Tabela 4.21). Rezultat je v skladu z encimskimi aktivnostmi encimskega ekstrakta, pri katerem smo določili nizke vsebnosti celulitičnih encimov. Rezultat encimske hidrolize z encimi Celluclast® 1.5L je pokazal, da celulaze niso uinkovite pri razgradnji LB in ostanka po fermentaciji. Veliko boljše rezultate pri razgradnji LB in ostanka po fermentaciji smo dosegli z encimi Viscozyme® L, ki so skupek različnih encimov. Iz rezultatov encimske hidrolize lahko zaključimo, da smo dosegli najvišjo uinkovitost encimske hidrolize LB in ostanka po fermentaciji z multi-encimskim kompleksom, ki vsebuje mnogo različnih encimov, tako oksidativnih kot tudi hidrolitičnih.

Iz ekonomskega vidika uporabe encimske hidrolize za predobdelavo LB in ostanka po fermentaciji lahko zaključimo, da je uporaba komercialnih encimov omejena zaradi visoke cene. Alternativna je uporaba encimskih ekstraktov pridobljenih z gojenjem gliv na nizko

cenovnih kmetijskih in lesnih ostankih. Tako pridobljeni encimi vsebujejo koktajl razli nih vrst encimov, ki delujejo kompleksno.

Nekaj študij encimskih hidroliz razli nih LB je bilo izvedenih z uporabo razli nih encimskih ekstraktov gliv. Lin Yunqin idr. [128] so preu evali biološko predobdelavo pred anaerobno fermentacijo pulpe in papirne brozge za izboljšanje produktivnosti metana. Uporabili so ekstrakt iz komposta gojiš glive *P. ostreatus* iz ene od farm, kjer so gojijo glivo. Rezultati so pokazali 34 % porast proizvodnje bioplina s predobdelanimi substrati z encimskimi ekstrakti. Encimski ekstrakt ligninaz in celulaz glive *P. ostreatus* in *Phanerochaete chrysosporium* pridobljen s fermentacijo na ostankih bananovcev je bil uporabljen za encimsko hidrolizo bananine kaše [129]. eprav so bile aktivnosti celulaz dva krat višje za glivo *P. chrysosporium*, je encimska hidroliza z ekstraktom glive *P. ostreatus* dosegla 96 % boljši izkoristek v primerjavi z uporabo ekstrakta glive *P. chrysosporium*.

Investicijski stroški predobdelave težko razgradljivih substratov, kot je LB, so trenutno visoki, zaradi visokih stroškov procesne tehnike. Trenutni razvoj v procesu proizvodnje bioplina se osredoto a na znižanje stroškov predobdelave substratov, ki niso namenjeni za prehrano ljudi in živali kot je LB. Z nadaljnjim razvojem bodo lahko stroški znižani do ekonomsko dostopne stopnje. Kakorkoli, predobdelava navadno ni potrebna za substrate z visoko vsebnostjo lahko razgradljivih komponent, ampak tudi pri uporabi takih substratov ob koncu procesa še vedno ostane del težko razgradljivih spojin, ki jih mikroorganizmi niso predelali in so prisotni v trdnem ostanku po fermentaciji. V procesih fermentacije v trdnem stanju za proizvodnjo bioplina, ki navadno delujejo v šaržnih reaktorjih, se zaradi stabilnosti procesa lahko del ostanka vra a ponovno v za etek procesa, saj se s tem lahko pripomore k stabilnosti procesa, zaradi možnega zakisanja procesa v za etni fazi hidrolize in acidogeneze anaerobne fermentacije. Z encimsko obdelavo ostanka, ki ga ponovno vrnemo v proces, lahko zmanjšamo koli ino ostanka po fermentaciji. Ob tem uporaba encimskega ekstrakta predstavlja okolju prijazen postopek predobdelave. Encimi se razgradijo v procesu anaerobne fermentacije.

5 Razprava

V laboratorijski raziskavi smo na sistemu AMPTS določili ali biometanski potencial LB. Vzorca LB sta bila odvzeta v različnem letnem času iz CERO Gajke. BMP za sveža substrata LB je imel vrednost 120 in 145 NmL CH₄/g OS. Rezultat potrjuje našo domnevo, da BMP vzorcev zbranih v različnem časovnem obdobju ni konstanten, ampak se spreminja glede na trenutno sestavo LB zbrano v lokalnem okolju. BMP LB je primerljiv z vrednostmi, ki jih navajajo drugi raziskovalci za anaerobne fermentacije organske frakcije komunalnih odpadkov v trdnem stanju in višji od BMP za različne lesne biomase. Glede na to, da smo v laboratorijskem merilu ugotovili, da je LB iz lokalnega okolja primerna za uporabo v anaerobni fermentaciji, smo fermentacijo preizkusili še na pilotnem merilu.

Anaerobno fermentacijo smo izvedli v pilotnem sistemu treh reaktorjev s strnjanim slojem z namenom študije možnosti proizvodnje bioplina iz LB v industrijsko primerljivem sistemu. LB smo pridobili v CERO Gajke, kjer je zbirni center za lokalno zbrane frakcije komunalnih odpadkov. LB pred procesom anaerobne fermentacije ni bila obdelana, saj smo v prvi fazi želeli preizkusiti učinkovitost procesa anaerobne fermentacije v trdnem stanju in termofilnem nivoju za neobdelano LB. LB smo pred začetkom procesa le zmleli z vrtnim drobilnikom, s tem smo povečali aktivno površino delcev LB. Trdna fermentacija ima tudi mnoge prednosti pred tekočo fermentacijo, kot so manjši volumen reaktorja za enako organsko obremenitev, manj gibajoči delci, manjši energijski vložek za mešanje, lažja obravnava ostanka po fermentaciji, večja toleranca do prisotnosti steklenih, plastičnih in kamnitih delcev med substratom. Pri fermentaciji v trdnem stanju tudi ni težav s plavanjem in razslojevanjem masel in vlaken ter s penjenjem substratov.

Pilotni sistem smo načrtovali in zgradili v lastni izvedbi. Naše vodilo pri tem je bilo, da s čim manjšimi stroški izdelamo preprost, a učinkovit pilotni sistem za izvajanje anaerobne fermentacije. Sistem smo sestavili iz treh reaktorjev, saj smo le na tak način lahko zagotovili optimalno pretakanje izcedne vode med reaktorji. Prav vpliv pretakanja izcedne vode med reaktorji na proizvodnjo bioplina je bil parameter, na katerega smo se v tem delu raziskav najbolj osredotočili. Pri izvedbi študij z LB je težko posplošiti rezultate iz vseh izvedenih poskusov, saj se sestava LB spreminja glede na sezonska opravila v gozdovih, parkih in vrtovih. Ne glede na sestavo LB, je pri vseh izvedenih poskusih bilo zaznati enak trend vpliva pretakanja izcedne vode na proizvodnjo bioplina, tudi proizvodnja bioplina se med posameznimi delujočimi reaktorji ni bistveno razlikovala. Z namenom podrobnega spremljanja procesa, smo med procesom anaerobne fermentacije spremljali temperaturo v reaktorju, volumen nastalega bioplina, sestavo bioplina, pH izcedne vode ter vsebnosti hlapnih maselnih kislin, KPK, celotnega dušika, celotnega organskega ogljika in alkalnosti v izcedni vodi.

Iz pridobljenih rezultatov lahko povzamemo glavno ugotovitev, da ima pretakanje izcedne vode močan pozitiven vpliv na učinkovitost in stabilnost anaerobne fermentacije v trdnem stanju, kot tudi na količino proizvedenega bioplina. Pretakanje izcedne vode v prvi fazi poskrbi za hitro stabilizacijo procesa v reaktorju in hiter dvig dnevnega nastajanja bioplina, saj se iz starega v novi reaktor prenesejo aktivne metanogene bakterije in pH zrele izcedne vode ima vrednost nad 7. S tem v prvi fazi preprečimo zakisanje procesa, saj je proizvodnja hlapnih maselnih kislin v fazi hidrolize in acidifikacije zelo intenzivna. Po stabilizaciji procesa smo izcedno vodo pretakali znotraj posameznega reaktorja. S tem smo v reaktorju zagotavljali konstantno vlažnost, prenos hranil in prenos mikroorganizmov po substratu,

hkrati pa smo s tem ohranjali visok nivo dnevne proizvodnje bioplina. Z drugim pretokom izcedne vode smo iz novega reaktorja prenesli sveža hranila, s katerimi smo dosegli ponovno povečanje dnevne proizvodnje bioplina, kar je doprineslo višjo skupno proizvodnjo bioplina in s tem boljši izkoristek sistema. BMP reaktorja pilotnega sistema je bil 120,95 L CH₄/kg OS, kar je primerljivo z vrednostmi za BMP iz sistema AMPTS. Za vzorce iz sistema AMPTS smo dobili približno 2 kratno količino proizvedene energije (2,66 in 2,32 MJ/kg_s) v primerjavi z rezultatom iz pilotne serije poskusov (1,22 MJ/kg_s). Predvidevamo, da so razlike v doprinosu kurilne vrednosti posledica različne obremenitve reaktorjev (tekoča in trdna fermentacija), v sistemu AMPTS je bilo vpeljeno mehansko mešanje reakcijske brozge in sistem smo zagnali z aktivno anaerobno združbo. Pilotni sistem je deloval brez mehanskega mešanja, v reaktorje ni bila dodana eksterna anaerobna združba. Tudi temperaturni nivo delovanja obeh sistemov je bil različen. Predpostavljamo, da je k višji donosnosti sistema AMPTS prispevala tudi mehanska predobdelava substratov, saj smo vzorce za uporabo v sistemu AMPTS fino zmelili, medtem ko so bili vzorci za pilotni sistem mnogo večji, saj so bili zdrobljeni le z vrtnim drobilnikom.

Drugi del raziskovalnega dela je bil namenjen biološki predobdelavi LB, katerega cilj je bil razgradnja LB v preprostejše spojine, ki jih mikroorganizmi v anaerobni fermentaciji lahko učinkovito predelajo v bioplin. Za biološko predobdelavo smo uporabili glivo bele trohnobe *P. ostreatus*, ki smo jo v prvem primeru gojili direktno na LB, v drugem primeru smo za razgradnjo uporabili le encime glive *P. ostreatus*, ki smo jih pridobili z lastno proizvodnjo. Učinkovitost razgradnje LB z direktnim gojenjem glive na LB smo preverili z določitvijo biometanskega potenciala vzorcem, na katerih smo gojili glivo. Gliva je razlikovno dolgo rastla na substratih, prav tako je bila gostota razraščene micelije različna med vzorci. Rezultati so pokazali, da gojenje glive direktno na substratih, pod pogoji uporabljenimi v naši študiji, negativno vpliva na proizvodnjo bioplina, saj glive za svojo rast porabijo najprej lahko dostopne spojine organske snovi, po razgradnji težje dostopnih pa tudi produkte razkroja uporabijo za svoje potrebe. BMP za sveža substrata LB je imel vrednost 120 in 145 NmL CH₄/g OS, medtem ko so bili BMP za substrate prerašene z gobo med 55 in 78 NmL CH₄/g OS.

S študijo gojenja glive *P. ostreatus* na različnih gojiščih smo raziskali sposobnost izoliranja zunajceličnih hidrolitičnih in oksidativnih encimov glive *P. ostreatus* v odvisnosti od inkubacijskega pogoja. Najvišje aktivnosti celulitičnih encimov (FPaz, CMCaz, α-glukozidaz), ksilanaz in lakaz smo dosegli na trdnem gojišču, ki je vsebovalo 80 % PO in 20 % LB. Na ostalih uporabljenih gojiščih je gliva počasneje rastla in encimske aktivnosti so bile nižje. Aktivnosti celulitičnih encimov in ksilanaz so bile veliko nižje od aktivnosti lakaz, ki so dosegle najvišjo aktivnost 2920,0 U/L na substratu PO1 6. dan gojenja micelije glive *P. ostreatus*. Ker je prav lakaza, med vsemi obravnavanimi encimi, odgovorna za razgradnjo ligninskih komponent in je tudi industrijsko zanimiva, smo v nadaljevanju izvedli eksperiment optimizacije fermentacijskih faktorjev za optimizacijo proizvodnje lakaz.

Taguchi ortogonalno matriko L18 (2¹ × 3⁷) smo uporabili pri izvedbi eksperimenta gojenja glive *P. ostreatus* na trdnem gojišču z namenom maksimiranja proizvodnje lakaz. Med osmimi izbranimi faktorji sta LB in glukoza imeli največji vpliv na proizvodnjo lakaz. S programom Minitab 17 smo določili najvišjo vrednost aktivnosti lakaz (30,37 U/g SS), ki bi jo lahko dosegli pri optimalnih pogojih določenih s programom. Za potrditev doseganja najvišje vrednosti aktivnosti lakaz, smo izvedli potrditveni eksperiment pri optimalnih pogojih: pH 6, 20 % LB, 10 g/L glukoze, 6 g/L kvasni ekstrakt, 15 g/L pepton, 3 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L MgSO₄·7H₂O in 0,1 g/L MnSO₄·H₂O. Po izvedenem eksperimentu (statični pogoji, v temi, inkubacijskem pogoju 8 dni in temperaturi 28 °C) smo dosegli aktivnosti lakaz 29,15 U/g SS. Doseženi rezultat je bil znotraj 95 % stopnje zanesljivosti, glede na

predvideno maksimalno vrednost proizvodnje lakaz. Taguchi metodo smo uspešno uporabili za testiranje faktorjev gojitvenega medija glive *P. ostreatus* za proizvodnjo lakaz, ki zagotavlja sistemati ni in u inkovit matemati ni pristop do razumevanja kompleksnega procesa proizvodnje lakaz preko optimizacije na rtovanih faktorjev.

Z encimsko hidrolizo LB z encimskim ekstraktom smo pridobili $2,122 \pm 0,039$ g/L glukoze, kar je za 12 % manj kot smo dosegli z uporabo komercialnega encima Viscozyme® L (mešanica celuliti nih encimov gliv rodu *Aspergillus*), pri katerem smo dolo ili najvišjo aktivnost ksilanaz, ki so odgovorne za razgradnjo komponent v hemicelulozi. Donos glukoze z uporabo encimov Celluclast® 1.5L (celulaze glive *Trichoderma reesei*) je bil za 56 % nižji od donosa glukoze z uporabo encimskega ekstrakta *P. osteratus*. Z encimsko hidrolizo ostanka po fermentaciji smo dosegli nizko donosnost glukoze pri vseh uporabljenih encimih v primerjavi z vsebnostjo glukoze pri razgradnji LB. Med rezultati encimske hidrolize ostanka po fermentaciji, je bil najboljši rezultat dosežen z encimsko hidrolizo encimskega ekstrakta *P. osteratus*. U inkovitost encimske hidrolize ostanka po fermentaciji z Celluclast® 1.5L je bila 65 % nižja in z Viscozyme® L je bila kar za 83 % nižja od u inkovitosti z encimskih ekstraktom. Nizka donosnost pri razgradnji ostanka po fermentaciji je posledica sestave ostanka, saj je organska snov v ostanku za 51 % nižja od organske snovi v LB. Z rezultati encimske hidrolize smo dokazali, da lahko z lastno proizvodnjo proizvedemo mešanico encimov, ki razgrajuje LB s primerljivo u inkovitostjo, kot lahko izvedemo encimsko hidrolizo z dolo enimi komercialno dostopnimi encimi. S poglobljeno študijo gojenja glive, z optimizacijo ravnega medija, kot tudi študijo razli nih ekstrakcijskih metod, bi lahko pridobili višje donosnosti proizvedenih encimov. Gliva *P. ostreatus* ni edina gliva, ki je sposobna proizvodnje hidroliti nih in oksidativnih encimov, smiselno bi bilo preizkusiti tudi gojenje drugih gliv in poskusiti encimsko hidrolizo z razli nimi encimskimi ekstrakti lastne proizvodnje.

Evropska komisija je zastavila cilj do leta 2020, da mora biti 20 % uporabljene energije proizvedeno iz obnovljivih virov energije. Bioplin je obnovljivi vir energije, ki vsebuje 55 – 65 % metana. Predobdelava LB in hidroliza sta podro ji, ki potrebujeta drasti ne izboljšave za ekonomsko sprejemljivo proizvodnjo bioplina iz kompleksnih organskih materialov kot sta LB in mulji istilnih naprav. Kljub novim tehnologijam, s katerimi se je proizvodnja bioplina mo no izboljšala, obstajajo še vedno izzivi, ki potrebujejo nadaljnje preiskave. Eden od izzivov se nanaša na podro je LB, saj predstavlja LB precej neizkoriš en vir obnovljive energije za bioplin. Mnogo faktorjev, kot so vsebnost lignina, kristalini nost celuloze in velikost delcev, omejuje razgradnjo hemiceluloze in celuloze v LB. Visoke cene komercialnih encimov omejujejo uporabo encimske hidrolize v bioplinarnah. Uporaba encimov za biološko predobdelavo je zanimiva tudi iz okoljevarstvenega vidika, saj pri uporabi encimov ne prihaja do stranskih produktov in so za okolje popolnoma neškodljivi, za uporabo pa niso potrebni dodatni energetski viri.

6 Zaključek

LB je poceni substrat, ki predstavlja alternativni vir obnovljive energije, iz katere se lahko proizvaja tudi bioplin. V nalogi smo ugotovili, da lahko LB iz lokalnega okolja uspešno anaerobno fermentiramo v šaržnih reaktorjih s strnjenim slojem in križnim pretakanjem izcedne vode. Ob tem smo ugotovili, da je pretakanje izcedne vode med reaktorji klju nega pomena za stabilnost procesa in pove ano proizvodnjo bioplina. Prisotnost lignina, kristalini nost celuloze in omejena površinska dostopnost zmanjšujejo biorazgradljivost LB, zato velja stopnja hidrolize za fazo ozkega grla v procesu pridobivanja bioplina. Da bi izboljšali u inkovitost procesa anaerobne fermentacije LB, smo le to biološko predobdelali z glivo *P. ostreatus* in encimi proizvedenimi z glivo *P. ostreatus*. Predobdelava z direktnim gojenjem glive *P. ostreatus* na vzorcih LB, pri pogojih uporabljenih v študiji, se je izkazala za neu inkovito, saj je bil biometanski potencial predobdelanih substratov nižji od substratov, na katerih ni bila uporabljena predobdelava. Na trdnem gojiš u, prilagojenem rastnim zahtevam glive, smo uspešno gojili glivo *P. ostreatus* za proizvodnjo celuliti nih in ligninoliti nih encimov. Aktivnosti celuliti nih encimov so bile nizke v primerjavi z aktivnostmi lakaz, ki razgrajujejo ligninske komponente. Ker veljajo lakaze za industrijsko zanimive encime, smo z optimizacijo po Taguchi metodi raziskali vpliv sestave gojiš a na produktivnost lakaz. Taguchi metoda z ortogonalno matriko L18 ($2^1 \times 3^7$) se je izkazala za uspešno, saj smo pridobili podatke za sestavo gojiš a, na katerem izlo i gliva *P. ostreatus* najve lakaz. Encimski ekstrakt glive *P. ostreatus* smo uporabili za encimsko hidrolizo LB in ostanka po fermentaciji. U inkovitost encimske hidrolize smo primerjali z uporabo dveh komercialnih encimov. Z encimskim ekstraktom smo pridobili primerljive rezultate s komercialno dostopnimi encimi. Ker predstavlja LB precej neizkoriš en vir obnovljive energije, bi bilo raziskave smiselno nadaljevati na podro ju razgradnje LB, saj bi na tak na in lahko izboljšali izkoriš enost potenciala LB kot vira obnovljive energije.

7 Literatura

- [1] National Renewable Energy Laboratory NREL. Evaluation of Pretreatments of Biomass for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. BiblioGov; 2012. 80 p.
- [2] Mussatto SI, Teixeira JA. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol Méndez-Vilas Ed.* 2010;2:897–907.
- [3] Merlin Christy P, Gopinath LR, Divya D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renew Sustain Energy Rev.* 2014 Jun;34:167–73.
- [4] Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol.* 2002 Jun;5(2):53–63.
- [5] Hurst CJ, Crawford RL. *Manual of environmental microbiology.* ASM Press; 2002. 1176 p.
- [6] Isikhuemhen OS, Mikiashvilli NA. Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009 Nov;36(11):1353–62.
- [7] Rashad MM, Abdou HM, Mahmoud AE, Nooman MU, others. Nutritional analysis and enzyme activities of *Pleurotus ostreatus* cultivated on *Citrus limonium* and *Carica papaya* wastes. *Aust J Basic Appl Sci.* 2009;3(4):3352–60.
- [8] Sánchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.* 2009 Mar;27(2):185–94.
- [9] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.* 2002 May;83(1):1–11.
- [10] Binner R, Menath V, Huber H, Thomm M, Bischof F, Schmack D, et al. Comparative study of stability and half-life of enzymes and enzyme aggregates implemented in anaerobic biogas processes. *Biomass Convers Biorefinery.* 2011 Jan 25;1(1):1–8.
- [11] Romano RT, Zhang R, Teter S, McGarvey JA. The effect of enzyme addition on anaerobic digestion of *Jose Tall Wheat Grass*. *Bioresour Technol.* 2009 Oct;100(20):4564–71.
- [12] Suárez Quiñones T, Plöchl M, Budde J, Heiermann M. Results of batch anaerobic digestion test – effect of enzyme addition. *Agric Eng Int CIGR J.* 2012 Mar 15;14(1):38–50.
- [13] Ziemi ski K, Romanowska I, Kowalska M. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to improve biogas production. *Waste Manag.* 2012 Jun;32(6):1131–7.
- [14] Adhikari R, Juanga JP, Visvanathan C. Anaerobic digestion of municipal solid waste in thermophilic sequential batch process, 2014. http://www.researchgate.net/publication/240611207_Anaerobic_digestion_of_municipal_solid_waste_in_thermophilic_sequential_batch_process (dostop: 30.1.2015)
- [15] Brown D, Shi J, Li Y. Comparison of solid-state to liquid anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks for biogas production. *Bioresour Technol.* 2012 Nov;124:379–86.
- [16] Zheng Y, Zhao J, Xu F, Li Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Prog Energy Combust Sci.* 2014 Jun;42:35–53.
- [17] Kim S, Holtzapple MT. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. *Bioresour Technol.* 2006 Mar;97(4):583–91.
- [18] Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod Biorefining.* 2008 Jan 1;2(1):26–40.

- [19] Sticklen M. Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels. *Curr Opin Biotechnol.* 2006 Jun;17(3):315–9.
- [20] Pandey JK, Kim C-S, Chu W-S, Lee CS, Jang D-Y, Ahn S-H. Evaluation of morphological architecture of cellulose chains in grass during conversion from macro to nano dimensions. *E-Polym.* 2009 Dec 1;9(1):1221–35.
- [21] Sjöström E. *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications.* Gulf Professional Publishing; 1993. 320 p.
- [22] Pictures for Lignocellulose structure
<http://biofuel.webgarden.com/sections/blog/pictures-for-lignocellulose> (dostop: 26. 10. 2014)
- [23] Zhang Y-HP, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng.* 2004 Dec 30;88(7):797–824.
- [24] Biermann CJ. 2 - Wood and Fiber Fundamentals. V: Biermann CJ, urednik. *Handbook of Pulping and Papermaking (Second Edition).* San Diego: Academic Press; 1996, p. 13–54.
- [25] Hu G, Heitmann JA, Rojas OJ. Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues. *BioResources.* 2008 Feb 12;3(1):270–94.
- [26] Hon DN-S, Shiraishi N. *Wood and Cellulosic Chemistry, Second Edition, Revised, and Expanded.* CRC Press; 2000. 930 p.
- [27] Fengel D, Wegener G. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.* Walter de Gruyter; 1983. 633 p.
- [28] Fan LT, Lee Y-H, Gharpuray MM. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. V: *Microbial Reactions.* Springer Berlin Heidelberg; 1982. p. 157–87.
- [29] Buswell JA, Odier E, Kirk TK. Lignin Biodegradation. *Crit Rev Biotechnol.* 1987 Jan 1;6(1):1–60.
- [30] Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 2006 Dec;24(12):549–56.
- [31] Khanal SK. *Bioenergy and Biofuel from Biowastes and Biomass.* ASCE Publications; 2010. 523 p.
- [32] Sánchez ÓJ, Cardona CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol.* 2008 Sep;99(13):5270–95.
- [33] Singhanian RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, Pandey A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb Technol.* 2010 Jun 7;46(7):541–9.
- [34] Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008 May 1;35(5):377–91.
- [35] Ryu DDY, Mandels M. Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme Microb Technol.* 1980 Apr;2(2):91–102.
- [36] Linder M, Teeri TT. The roles and function of cellulose-binding domains. *J Biotechnol.* 1997 Sep 16;57(1–3):15–28.
- [37] Hall M, Bansal P, Lee JH, Realff MJ, Bommarius AS. Biological pretreatment of cellulose: Enhancing enzymatic hydrolysis rate using cellulose-binding domains from cellulases. *Bioresour Technol.* 2011 Feb;102(3):2910–5.
- [38] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology.* *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Sep 1;66(3):506–77.

- [39] Yoon LW, Ang TN, Ngoh GC, Chua ASM. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass Bioenergy*. 2014 Aug;67:319–38.
- [40] Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005 Jun;67(5):577–91.
- [41] Wang M, Li Z, Fang X, Wang L, Qu Y. Cellulolytic Enzyme Production and Enzymatic Hydrolysis for Second-Generation Bioethanol Production. V: Bai F-W, Liu C-G, Huang H, Tsao GT, uredniki. *Biotechnology in China III: Biofuels and Bioenergy*. Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 1–24.
- [42] Niladevi KN. Ligninolytic Enzymes. V: Nigam PS nee', Pandey A, urednika. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Springer Netherlands; 2009. p. 397–414.
- [43] Piontek K, Antorini M, Choinowski T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem*. 2002 Oct 4;277(40):37663–9.
- [44] Claus H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 2004 Jan;35(1–2):93–6.
- [45] Banci L. Structural properties of peroxidases. *J Biotechnol*. 1997 Mar 14;53(2–3):253–63.
- [46] Pohleven, Franc. Gobje bogastvo Bele krajine. V: Štangelj, M (ur.), idr. *Narava Bele krajine*. Metlika: Belokranjski muzej, 2013, str. 88-93.
- [47] Young RA, Akhtar M. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. John Wiley & Sons; 1998. 594 p.
- [48] Liese W. Ultrastructural Aspects of Woody Tissue Disintegration. *Annu Rev Phytopathol*. 1970;8(1):231–58.
- [49] Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol*. 2005 Sep;8(3):195–204.
- [50] Cohen R, Persky L, Hadar Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002 Apr;58(5):582–94.
- [51] Stamets P. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. 3 edition. Berkeley, Calif: Ten Speed Press; 2000. 614 p.
- [52] Zdražil F. Cultivation of *Pleurotus*. In: Chang ST, Hayes WA, urednika. *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. Academic Press; 1978. p. 521–572.
- [53] Reddy GV, Ravindra Babu P, Komaraiah P, Roy KRRM, Kothari IL. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem*. 2003 May;38(10):1457–62.
- [54] Qinnghé C, Xiaoyu Y, Tianguí N, Cheng J, Qiugang M. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochem*. 2004 Jul 30;39(11):1561–6.
- [55] Gregori A, Švagelj M, Pahor B, Berovi M, Pohleven F. The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. *New Biotechnol*. 2008 Oct;25(2–3):157–61.
- [56] Khalil MI, Hoque MM, Basunia MA, Alam N, Khan MA. Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass. *Turk J Agric For*. 2011 Jul 29;35(4):333–41.

- [57] Ruiz-Rodríguez A, Polonia I, Soler-Rivas C, Wichers HJ. Ligninolytic enzymes activities of Oyster mushrooms cultivated on OMW (olive mill waste) supplemented media, spawn and substrates. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2011 Mar;65(2):285–93.
- [58] Dugba PN, Zhang R. Treatment of dairy wastewater with two-stage anaerobic sequencing batch reactor systems — thermophilic versus mesophilic operations. *Bioresour Technol*. 1999 Jun;68(3):225–33.
- [59] Veeken AH, Hamelers BV. Effect of substrate-seed mixing and leachate recirculation on solid state digestion of biowaste. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res*. 2000;41(3):255–62.
- [60] Kayode Feyisetan Adekunle JAO. A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *Adv Biosci Biotechnol*. 2015;06(03):205–12.
- [61] Cirne D g., Lehtomäki A, Björnsson L, Blackall L I. Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *J Appl Microbiol*. 2007 Sep 1;103(3):516–27.
- [62] Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int J Mol Sci*. 2008 Sep 1;9(9):1621–51.
- [63] Vavilin VA, Rytov SV, Lokshina LY. A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresour Technol*. 1996 May;56(2–3):229–37.
- [64] Lai TE, Nopharatana A, Pullammanappallil PC, Clarke WP. Cellulolytic activity in leachate during leach-bed anaerobic digestion of municipal solid waste. *Bioresour Technol*. 2001 Dec;80(3):205–10.
- [65] Fernandes TV, Klaasse Bos GJ, Zeeman G, Sanders JPM, van Lier JB. Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*. 2009 May;100(9):2575–9.
- [66] Mosey FE, Fernandes XA. Patterns of Hydrogen in Biogas from the Anaerobic Digestion of Milk-Sugars. *Water Sci Technol*. 1989;21(4/5):187-96.
- [67] Gujer W, Zehnder AJB. Conversion Processes in Anaerobic Digestion. *Water Sci Technol*. 1989;15(8/9):127-67.
- [68] Kalyuzhnyi S, Veeken A, Hamelers B. Two-particle model of anaerobic solid state fermentation. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res*. 2000;41(3):43–50.
- [69] Pesta G. Anaerobic Digestion of Organic Residues and Wastes. V: Oreopoulou V, Russ W, urednika. Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry. Springer US; 2007. p. 53–72.
- [70] Demirel B, Yenigün O. Two-phase anaerobic digestion processes: a review. *J Chem Technol Biotechnol*. 2002 Jul 1;77(7):743–55.
- [71] Elefsiniotis P, Oldham WK. Influence of pH on the acid-phase anaerobic digestion of primary sludge. *J Chem Technol Biotechnol*. 1994 May 1;60(1):89–96.
- [72] Pavlostathis SG, Giraldo-Gomez E. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. *Crit Rev Environ Control*. 1991 Jan 1;21(5-6):411–90.
- [73] Hwang S, Lee Y, Yang K. Maximization of acetic acid production in partial acidogenesis of swine wastewater. *Biotechnol Bioeng*. 2001 Dec 5;75(5):521–9.
- [74] Shively JM, Barton LL. Variations in autotrophic life. London; San Diego: Academic; 1991.
- [75] Xing J, Criddle C, Hickey R. Effects of a long-term periodic substrate perturbation on an anaerobic community. *Water Res*. 1997 Sep;31(9):2195–204.
- [76] Salminen E, Rintala J, Lokshina LY, Vavilin VA. Anaerobic batch degradation of solid poultry slaughterhouse waste. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res*. 2000;41(3):33–41.

- [77] Sekiguchi Y, Kamagata Y, Harada H. Recent advances in methane fermentation technology. *Curr Opin Biotechnol.* 2001 Jun 1;12(3):277–82.
- [78] Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, uredniki. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology.* Springer New York; 2001.
- [79] Ferry JG. Enzymology of the fermentation of acetate to methane by *Methanosarcina thermophila*. *BioFactors.* 1997 Jan 1;6(1):25–35.
- [80] Chugh S, Chynoweth DP, Clarke W, Pullammanappallil P, Rudolph V. Degradation of unsorted municipal solid waste by a leach-bed process. *Bioresour Technol.* 1999 Aug;69(2):103–15.
- [81] Kangle KM, Kore SV, Kore VS, Kulkarni GS. Recent trends in anaerobic codigestion; A review. *Univers J Environ Res Technol.* 2012;(2):210–9.
- [82] Mata-Alvarez J. *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes.* IWA Publishing; 2003. 292 p.
- [83] Harmon JL, Svoronos SA, Lyberatos G, Chynoweth D. Adaptive temperature optimization of continuous anaerobic digesters. *Biomass Bioenergy.* 1993;5(3-4):279–88.
- [84] Kim DH, Oh SE. Continuous high-solids anaerobic co-digestion of organic solid wastes under mesophilic conditions. *Waste Manag.* 2011 Oct;31(9-10):1943–8.
- [85] Zaher U, Li R, Jeppsson U, Steyer JP, Chen S. GISCOD: General Integrated Solid Waste Co-Digestion model. *Water Res.* 2009 Jun;43(10):2717–27.
- [86] Nayono SE. *Anaerobic Digestion of Organic Solid Waste for Energy Production.* KIT Scientific Publishing; 2010. 152 p.
- [87] Braun R. Anaerobic digestion: a multi-faceted process for energy, environmental management and rural development. V: Ranalli P, urednik. *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses.* Springer Netherlands; 2007. p. 335–416.
- [88] Mudrack K, Kunst S. *Biologie der Abwasserreinigung.* 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2003. 206 p.
- [89] Chynoweth DP, Bosch G, Earle JFK, Legrand R, Liu K. A novel process for anaerobic composting of municipal solid waste. *Appl Biochem Biotechnol.* 1991 Mar;28-29(1):421–32.
- [90] Montgomery DC. *Design and Analysis of Experiments.* John Wiley & Sons; 2005. 643 p.
- [91] Taguchi G, Chowdhury S, Wu Y. *Taguchi's Quality Engineering Handbook.* Wiley; 2005. 1708 p.
- [92] Jej i V, Poje T. Bioplin v kmetijstvu. Informacije za proizvodnjo bioplina v Sloveniji. Kmetijski inštitut Slovenije; <http://www.biogasregions.org/doc/brochures/AIS.pdf/> (dostop: 21. 8. 2015).
- [93] Eaton AD, Franson MAH. *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater.* American Public Health Association; 2005. 1382 p.
- [94] Dearman B, Marschner P, Bentham RH. Methane production and microbial community structure in single-stage batch and sequential batch systems anaerobically co-digesting food waste and biosolids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006 Jan;69(5):589–96.
- [95] Geotech. GA2000Plus Gas Analyser Operating Manual 2010. <http://www.keison.co.uk/products/geotechnical/GA2000Manual.pdf/> (dostop: 15. 9. 2015).
- [96] Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem.* 1959 Mar 1;31(3):426–8.
- [97] Zhang YHP, Hong J, Ye X. *Cellulase Assays.* V: Mielenz JR, urednik. *Biofuels.* Humana Press; 2009. p. 213–31.

- [98] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*. 1987 Jan 1;59(2): 257-68.
- [99] Ghose TK, Bisaria VS. Measurement of hemicellulase activities: Part I Xylanases. *Pure Appl Chem*. 1987 Jan 1;59(12): 1739-51.
- [100] Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol*. 1992 May;23(3):257-70.
- [101] Mishra A, Kumar S. Cyanobacterial biomass as N-supplement to agro-waste for hyper-production of laccase from *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Process Biochem*. 2007 Apr;42(4):681-5.
- [102] Kafle GK, Kim SH, Sung KI. Ensiling of fish industry waste for biogas production: A lab scale evaluation of biochemical methane potential (BMP) and kinetics. *Bioresour Technol*. 2013 Jan;127:326-36.
- [103] Fernández J, Pérez M, Romero LI. Effect of substrate concentration on dry mesophilic anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Bioresour Technol*. 2008 Sep;99(14):6075-80.
- [104] Rana IS, Rana AS. Lignocellulolytic Enzyme Profile of *Agaricus* and *Pleurotus* Species Cultured on used Tea Leaves Substrate. *Lignocellulolytic Enzyme Profile Agaricus Pleurotus Species Cult Used Tea Leaves Substrate*. 2011;11(06):10-4.
- [105] Kurt S, Buyukalaca S. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. *Bioresour Technol*. 2010 May;101(9):3164-9.
- [106] Kyu KL, Ratanakhanokchai K, Uttapap D, Tanticharoen M. Induction of xylanase in *Bacillus circulans* B6. *Bioresour Technol*. 1994;48(2):163-7.
- [107] Verma P, Madamwar D. Production of ligninolytic enzymes for dye decolorization by cocultivation of white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*. 2002 Dec;102-103(1-6):109-18.
- [108] Gupte A, Gupte S, Patel H. Ligninolytic enzyme production under solidstate fermentation by white rot fungi. *J Sci Ind Res*. 2007;66(8):611.
- [109] Arora DS, Sharma RK. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Appl Biochem Biotechnol*. 2009 Jun 10;160(6):1760-88.
- [110] Chagas EP, Durrant LR. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme Microb Technol*. 2001 Nov 5;29(8-9):473-7.
- [111] Levin L, Forchiassin F, Viale A. Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process Biochem*. 2005 Mar;40(3-4):1381-7.
- [112] Qi-he C, Krügener S, Hirth T, Rupp S, Zibek S. Co-cultured Production of Lignin-Modifying Enzymes with White-Rot Fungi. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011 Jun 7;165(2):700-18.
- [113] Papinutti VL, Forchiassin F. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *J Food Eng*. 2007 Jul;81(1):54-9.
- [114] Beaugrand J, Reis D, Guillon F, Debeire Philippe, Chabbert B. Xylanase-Mediated Hydrolysis of Wheat Bran: Evidence for Subcellular Heterogeneity of Cell Walls. *Int J Plant Sci*. 2004 Jul 1;165(4):553-63.
- [115] Maes C, Delcour JA. Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction of Wheat Bran Non-starch Polysaccharides. *J Cereal Sci*. 2001 Jul;34(1):29-35.
- [116] Babu KR, Satyanarayana T. α -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. *Process Biochem*. 1995;30(4):305-9.

- [117] Gessesse A, Mamo G. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol.* 1999 Jul 15;25(1–2):68–72.
- [118] Tinoco R, Acevedo A, Galindo E, Serrano-Carreón L. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2010 Aug 9;38(4):531–40.
- [119] Mikiashvili N, Wasser SP, Nevo E, Elisashvili V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World J Microbiol Biotechnol.* 2006 Feb 8;22(9):999–1002.
- [120] Periasamy R, Palvannan T. Optimization of laccase production by *Pleurotus ostreatus* IMI 395545 using the Taguchi DOE methodology. *J Basic Microbiol.* 2010 Dec;50(6):548–56.
- [121] Janusz G, Rogalski J, Szczodrak J. Increased production of laccase by *Cerrena unicolor* in submerged liquid cultures. *World J Microbiol Biotechnol.* 2007 May 5;23(10):1459–64.
- [122] Moharib SA, Abdel-Rahman TM, Moussa TA-M, Yehia RS. Effect of media composition on laccase production by *Pleurotus ostreatus* in batch culture. *Electron J Pol Agric Univ.* 2011;14(3):10.
- [123] Adebayo EA, Martinez-Carrera D. Oyster mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. *Afr J Biotechnol.* 2015 Jan 7;14(1):52–67.
- [124] Karp SG, Faraco V, Amore A, Birolo L, Giangrande C, Soccol VT, et al. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol.* 2012 Jun;114:735–9.
- [125] Membrillo I, Sánchez C, Meneses M, Favela E, Loera O. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresour Technol.* 2008 Nov;99(16):7842–7.
- [126] Iandolo D, Piscitelli A, Sannia G, Faraco V. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011 Jan;163(1):40–51.
- [127] Staji M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser SP, Nevo E, et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme Microb Technol.* 2006 Jan 3;38(1–2):65–73.
- [128] Yunqin L, Dehan W, Lishang W. Biological pretreatment enhances biogas production in the anaerobic digestion of pulp and paper sludge. *Waste Manag Res J.* 2010 Sep;28(9):800–10.
- [129] Mena-Espino X, Barahona-Pérez F, Alzate-Gaviria L, Rodríguez-Vázquez R, Tzecz-Simá M, Domínguez-Maldonado J, et al. Saccharification with *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* enzymatic extracts of pretreated banana waste. *Afr J Biotechnol.* 2013 Sep 4;10(19):3824–34.

8 Življenjepis

OSEBNI PODATKI

Belšak Šel Nataša

📍 Spuhlja 10, 2250 Ptuj (Slovenija)

✉ natasa.belsak@gmail.com

DELOVNE IZKUŠNJE

12. 2008–6. 2015 **Mlada raziskovalka**
ZRS Bistra Ptuj, Ptuj (Slovenija)

IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE

10. 2003–9. 2008 **Univerzitetna diplomirana inženirka kemijske tehnologije** Raven 7 EOK

Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
Smetanova ulica 17, 2000 Maribor (Slovenija)

Področje kemijske tehnologije in biokemijske tehnike

9. 1999–6. 2003 **Gimnazijska maturantka**
Škofijska gimnazija Antona Martina Slomška, Maribor (Slovenija)

Poučevanje v programu za splošno gimnazijo

KOMPETENCE

Materni jezik slovenščina

Drugi jeziki	RAZUMEVANJE		GOVORJENJE		PISNO SPOROČANJE
	Slušno razumevanje	Bralno razumevanje	Govorno sporazumevanje	Govorno sporočanje	
angleščina	C1	C1	C1	C1	C1
nemščina	B1	B1	B1	A2	A2

Stopnja: A1 in A2: Osnovni uporabnik - B1 in B2: Samostojni uporabnik - C1 in C2: Usposobljeni uporabnik
[Skupni evropski jezikovni okvir](#)

Digitalna kompetenca

SAMOVREDNOTENJE				
Obdelava informacij	Komunikacija	Ustvarjanje vsebin	Varnost	Reševanje problemov
Samostojni uporabnik	Samostojni uporabnik	Samostojni uporabnik	Samostojni uporabnik	Samostojni uporabnik

[Digitalne kompetence - Samoocenjevalna lestvica](#)

UNIVERZA V MARIBORU
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Izjava doktorskega kandidata

Podpisana **Nataša Belšak Šel**, vpisna številka **95032879**

izjavljam,

da je doktorska disertacija z naslovom **Razgradnja lignocelulozne biomase z glivo *Pleurotus ostreatus* pred procesom anaerobne fermentacije v trdnem stanju**

- rezultat lastnega raziskovalnega dela,
- da predložena disertacija v celoti ali v delih ni bila predložena za pridobitev kakršnekoli izobrazbe po študijskih programih drugih fakultet ali univerz,
- da so rezultati korektno navedeni in
- da nisem kršil-a avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Podpis doktorskega kandidata

Bibliografija kandidata

LANKI IN DRUGI SESTAVNI DELI

1.01 Izvirni znanstveni lanek

1. BRGLEZ, Polonca, HOLOBAR, Andrej, PIVEC, Aleksandra, BELŠAK, Nataša, KOLAR, Mitja. Determination of oxygen by means of a biogas and gas - interference study using an optical tris (4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) ruthenium(II) dichloride complex sensor. *Acta chimica slovenica*, ISSN 1318-0207. [Tiskana izd.], 2012, vol. 59, no. 1, str. 50-58, ilustr. <http://acta.chem-soc.si/59/59-1-50.pdf>. [COBISS.SI-ID [15889686](#)], [JCR, SNIP, WoS do 7. 5. 2014: št. citatov (TC): 1, istih citatov (CI): 1, normirano št. istih citatov (NC): 0, Scopus do 16. 4. 2014: št. citatov (TC): 1, istih citatov (CI): 1, normirano št. istih citatov (NC): 0]

1.05 Poljudni lanek

2. BELŠAK, Nataša. Uspešno raziskovalno delo na področju ravnanja z različnimi vrstami vre k. *Ptuj an*, ISSN 1318-8550, 25. jul. 2011, leto 17, št. 7/8, str. 25. [COBISS.SI-ID [23014968](#)]

1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

3. BELŠAK, Nataša, GREGORI, Andrej, LEITGEB, Maja, KLINAR, Dušan, ELAN, Štefan. Uporaba fermentacije v trdnem stanju za proizvodnjo lignocelulolitičnih encimov z glivo *Pleurotus ostreatus* = Lignocellulolytic enzymes production by *Pleurotus ostreatus* solid state fermentation. V: Slovenski kemijski dnevi 2015, Ljubljana, 24. - 25. september 2015 = Slovenian Chemical Days 2015, Ljubljana, September 24 - 25, 2015. KAU I, Veneslav (ur.), et al. *Zbornik referatov in povzetkov*. Ljubljana: Slovensko kemijsko društvo, 2015, str. [1-7]. [COBISS.SI-ID [18979350](#)]

4. BELŠAK, Nataša, OSOJNIK RNIVEC, Ilja Gasan, PINTAR, Albin, PIVEC, Aleksandra. Bioplinski potencial trdnih organskih odpadkov biološko pred obdelanih z glivo *Pleurotus ostreatus* = Biogas potential of organic waste biologically pre-treated with fungi *Pleurotus ostreatus*. V: KRAVANJA, Zdravko (ur.), BRODNJAK-VON INA, Darinka (ur.), BOGATAJ, Miloš (ur.). *Slovenski kemijski dnevi 2012, Portorož, 12.-14. september 2012 = Slovenian Chemical Days 2012, Portorož, September 12-14, 2012*. Maribor: FKKT, 2012, str. 1-8. [COBISS.SI-ID [5070618](#)]

5. BELŠAK, Nataša, ELAN, Štefan, LEITGEB, Maja, PIVEC, Aleksandra. Thermophilic solid state anaerobic digestion of OFMSW in sequential batch reactors. V: *1st International Conference on Waste Management in Developing Countries and Transient Economies, Mauritius, Africa, 5-8 September 2011*. [S. l.]: Edulink, 2011, str. 1-8, graf. prikazi. [COBISS.SI-ID [23244600](#)]

6. BELŠAK, Nataša, PIVEC, Aleksandra, ORI , Miroslav, LEITGEB, Maja, ŠVAGELJ, Mirjan, GREGORI, Andrej. Lignocellulose biomass pretreatment with white and brown rot fungi before the anaerobic digestion process. V: 2nd Conference on Applied Biocatalysis and 7th Meeting of Students and University Professors from Maribor and Zagreb, November 7th and 8th 2011, Maribor, Slovenia. LEITGEB, Maja (ur.), PRIMOŽI , Mateja (ur.). *2nd Conference on "Applied Biocatalysis" and 7th Meeting of Students and University Professors from Maribor and Zagreb, November 7th and 8th 2011, Maribor, Slovenia.* Maribor: Faculty of Chemistry and Chemical Engineering; Zagreb: Faculty of Chemical Engineering and Technology, 2011, 6 str., ilustr. [COBISS.SI-ID [23245368](#)]

7. BELŠAK, Nataša, ELAN, Štefan, LEITGEB, Maja, KLINAR, Dušan, PIVEC, Aleksandra. Proces anaerobne digestije organskega odpada v pilotnem sistemu treh zaporednih šaržnih reaktorjev = Anaerobic digestion process of organic waste in pilot sistem of three sequential batch reactors. V: *Slovenski kemijski dnevi 2010, Maribor, 23. in 24. september 2010.* [Maribor]: FKKT, [2010], 11 str. [COBISS.SI-ID [14428438](#)]

8. PIVEC, Aleksandra, LAH, Branko, ŠVAGELJ, Mirjan, KLINAR, Dušan, BEROVI , Marin, BELŠAK, Nataša. Anaerobna digestija lignocelulozne biomase - predhodna obdelava substrata = Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass - pretreatment. V: *Slovenski kemijski dnevi 2010, Maribor, 23. in 24. september 2010.* [Maribor]: FKKT, [2010], str. 1-12. [COBISS.SI-ID [34462725](#)]

9. BELŠAK, Nataša, ELAN, Štefan, LEITGEB, Maja, KLINAR, Dušan, PIVEC, Aleksandra. Optimizacija procesa anaerobne digestije za proizvodnjo bioplina ter priprava ostanka za odlaganje na deponijo. V: *Slovenski kemijski dnevi 2009, Maribor, 24. in 25. september 2009.* [Maribor]: FKKT, [2009], 9 str. [COBISS.SI-ID [13467670](#)]

1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci

10. BELŠAK, Nataša, OSOJNIK RNIVEC, Ilja Gasan, PINTAR, Albin, PIVEC, Aleksandra. Bioplinski potencial trdnih organskih odpadkov biološko pred obdelanih z glivo *Pleurotus ostreatus*. V: *Slovenski kemijski dnevi 2012, Portorož, 12. in 14. september 2012.* KRAVANJA, Zdravko (ur.), BRODNJAK-VON INA, Darinka (ur.), BOGATAJ, Miloš (ur.). *Zbornik povzetkov referatov s posvetovanja.* Maribor: FKKT, 2012, str. 187. [COBISS.SI-ID [5073434](#)]

11. BELŠAK, Nataša, PIVEC, Aleksandra, ORI , Miroslav, LEITGEB, Maja, ŠVAGELJ, Mirjan, GREGORI, Andrej. Predobdelava lignocelulozne biomase z glivami bele in rjave trohnobe pred procesom anaerobne digestije = Lignocellulose biomass pretreatment with white and brown rot fungi before the anaerobic digestion process. V: 2nd Conference on Applied Biocatalysis and 7th Meeting of Students and University Professors from Maribor and Zagreb, November 7th and 8th 2011, Maribor, Slovenia. LEITGEB, Maja (ur.), PRIMOŽI , Mateja (ur.). *Book of abstracts.* Maribor: Faculty of Chemistry and Chemical Engineering; Zagreb: Faculty of Chemical Engineering and Technology, 2011, str. 18-19. [COBISS.SI-ID [23245624](#)]

MONOGRAFIJE IN DRUGA ZAKLJU ENA DELA

2.11 Diplomsko delo

12. BELŠAK, Nataša. *Anaerobna digestija biomase v trdnem stanju za proizvodnjo bioplina : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa.* Maribor: [N. Belšak], 2008. 64 f., ilustr. [COBISS.SI-ID [12868630](#)]

2.13 Elaborat, predstudija, študija

13. VOVK KORŽE, Ana, PIVEC, Aleksandra, POTISK, Julija, BELŠAK, Nataša. *Strokovne podlage za umešanje ERM na VVO območja na Dravskem polju.* Ptuj: Znanstveno-raziskovalno središče Bistra, 2010. 41 f., ilustr. [COBISS.SI-ID [18470152](#)]

IZVEDENA DELA (DOGODKI)

3.15 Prispevek na konferenci brez natisa

14. BELŠAK, Nataša. *Produkcija celuloznih encimov z glivo Pleurotus ostreatus in encimska hidroliza lignoceluloznega substrata pred procesom anaerobne fermentacije = Production of cellulolytic enzymes by the fungus Pleurotus ostreatus and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates prior to the process of anaerobic fermentation : prispevek na delavnici "Trajnostna potrošnja in proizvodnja v kemijskih in procesnih industrijah", "Zelena topila - Uporabna biokataliza". Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Slomškov trg 15, dvorana Frana Miklošiča, 11. in 12. 11. 2014.* [COBISS.SI-ID [25139256](#)]

SEKUNDARNO AVTORSTVO

Somentor - drugo

15. BEZJAK, Jan, BEZJAK, Katja. *Obnašanje različnih vrst vrečk v kompostu, v vodi, na zraku in v zemlji : ekologija z varstvom okolja : raziskovalna naloga.* Ptuj: Osnovna šola Mladika, 2011. 64 str., ilustr. [COBISS.SI-ID [23015224](#)]

16. DJAKOVIČ, Ivana, HORVAT, Larisa. *Informiranje o uporabi in koristna uporaba odpadne kartonske embalaže za tekoča živila : ekologija z varstvom okolja : raziskovalna naloga.* Ptuj: Osnovna šola Mladika, 2010. 72 f., ilustr. [COBISS.SI-ID [22568760](#)]

17. DJAKOVIČ, Ivana, HORVAT, Larisa. *Zbiranje, predelava in ponovna uporaba kartonske embalaže za tekoča živila : ekologija z varstvom okolja : raziskovalna naloga.* Ptuj: Osnovna šola Mladika, 2009. 48 f., ilustr. [COBISS.SI-ID [21286200](#)]

Fotograf

18. KAFEL, Sašo (urednik), MRŠEK, Nataša (urednik). *Bistroum : zbornik recenzij raziskovalnih nalog.* Ptuj: Znanstveno-raziskovalno središče Bistra, 2011. ISBN 978-961-6253-36-9. [COBISS.SI-ID [67302913](#)]