

# Predobrada pšenične slame za proizvodnju bioetanola

---

Ivančić, Fran

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:952374>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Fran Ivančić**

6421/BT

**PREDOBRADA PŠENIČNE SLAME ZA  
PROIZVODNJU BIOETANOLA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul: Biokemijsko Inženjerstvo**

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

**Zagreb, 2016.**

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,  
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

### PREDOBRADA PŠENIČNE SLAME ZA PROIZVODNJU BIOETANOLA

*Fran Ivančić, 6421/BT*

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je provesti predobradu lignocelulozne sirovine (pšenične slame podrijetlom iz Hrvatskog Zagorja) u visokotlačnom reaktoru s  $H_2SO_4$  kao katalizatorom i istražiti utjecaj različitih koncentracija kiseline i vremena zadržavanja na sastav hidrolizata. Također, željelo se optimizirati postupak predobrade slame podešavanjem vremena zadržavanja i koncentracije kiseline, kako bi se dobila tekuća faza za uzgoj mikroorganizama, s visokom koncentracijom fermentabilnih šećera i malim udjelom inhibitora fermentacije. Sastav predobrađene sirovine praćen je tijekom eksperimenata pomoću HPLC-a. Sastav izvorne sirovine uključuje 43,7 % glukana, 21,83 % ksilana i 3,37 % arabinana te 1,65 % octene kiseline, 0,85 % furana, 10,75 % lignina, od čega 0,27 % lignina netopivog u kiselini i 10,48 % lignina topivog u kiselini. Sadržaj proteina iznosi 4 %, a pepela 6 %. Najveće koncentracije fermentabilnih šećera od 13,89 % (ukupno glukan 7,34 %, ksilan 5,41 % i arabinan 1,14 %) dobivene su kod predobrade pšenične slame u uvjetima od 210 °C, 20 bara, 5 minuta zadržavanja i 0,5 %  $H_2SO_4$ . U prethodno navedenim uvjetima zabilježene su i najmanje koncentracije inhibitora fermentacije (furana, mravlje kiseline, octene kiseline i levulinske kiseline).

**Ključne riječi:** pšenična slama, predobrada, kiselina, visokotlačni reaktor, bioetanol

**Rad sadrži:** 57 stranica, 20 slika, 12 tablica, 74 literaturna navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** Hrvatski

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

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

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

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

**Rad predan:** Rujan, 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

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

### PRETREATMENT OF WHEAT STRAW FOR BIOETHANOL PRODUCTION

*Fran Ivančić, 6421/BT*

**Abstract:** The objective of this research was to conduct a pretreatment of a lignocellulose raw material (wheat straw from Hrvatsko Zagorje) for bioethanol production in a high pressure reactor with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as a catalyst, as well as to investigate the influence of different acid concentrations and retention times on hydrolysate composition. Furthermore, the purpose of this study was to optimise the pretreatment by regulating retention time and acid concentration, as to obtain high concentration of fermentable sugars as well as minimal inhibitors content in the liquid phase. The wheat straw hydrolysate composition was monitored during the experiments with the use of HPLC. Composition of untreated straw includes 43,70 % glucan, 21,83 % xylan, 3,37 % arabinan, 1,65 % acetic acid and 0,85 % furans, while the share of acid soluble lignin amounts to 0,27 % and that of acid insoluble lignin 10,48 %. Straw contains 4 % proteins and 6 % ash. Largest concentration of fermentable sugars amounting to 13,89 % total (7,34 % glucan, 5,41 % xylan and 1,14 % arabinan) was obtained under conditions of 210 °C and 20 bar at 5 minutes retention time with 0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Under these conditions lowest yields of fermentation inhibitors were also detected (furans, formic acid, acetic acid and levulinic acid).

**Keywords:** Wheat straw, pretreatment, acid, high pressure reactor, bioethanol

**Thesis contains:** 57 pages, 20 figures, 12 tables, 1 supplement

**Original in:** Croatian

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

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

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

**Thesis delivered:** September, 2016.

*Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu u sklopu projekta „Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9158) pod vodstvom prof. dr. sc. Božidara Šanteka, a dr. sc. Mario Novak je sudjelovao kao pomoć pri izradi.*

#### ZAHVALA:

*Ovom prilikom htio bih zahvaliti svom mentoru, prof. dr. sc. Božidaru Šanteku koji mi je pružio mogućnost sudjelovati na ovom projektu te asistentima dr. sc. Mariu Novaku i dr. sc. Antoniji Trontel na njihovu vodstvu i pomoći, bez čijeg strpljenja ovo ne bi bilo moguće. Hvala im što su me tjerali da uvijek dam sve od sebe i odgovarali na moja brojna pitanja te tako pomicali granice moga znanja i mogućnosti. Također se zahvaljujem svim drugim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva koji su pomagali u odradi eksperimenata.*

*Veliku zahvalu dugujem i svojim dvjema kolegicama koje su mi s iznimnom voljom i odlučnošću pomagale te tako olakšale rad i stvorile vrlo prijateljsku atmosferu za rad u laboratoriju.*

*Posebno se želim zahvaliti svojoj obitelji i svim prijateljima koji su me uvijek podržavali u svakoj mojoj odluci i bili uz mene u dobrim i lošim trenutcima. Uz njihove riječi podrške bilo mi je mnogo lakše.*

## Sažetak:

<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>4</b>
2.1 Biogoriva.....	5
2.1.1 Općenito o biogorivima.....	5
2.1.1.1 Biogoriva prve generacije .....	5
2.1.1.2 Biogoriva druge generacije .....	6
2.1.1.3 Biogoriva treće generacije.....	6
2.1.2 Bioetanol .....	7
2.1.3 Biobutanol.....	8
2.1.4 Biodizel .....	9
2.1.5 Bioplin.....	10
2.2 Lignocelulozna biomasa.....	11
2.2.1 Općenito o lignoceluloznoj biomasi.....	11
2.2.2 Sastav .....	11
2.2.2.1 Celuloza.....	11
2.2.2.2 Hemiceluloza.....	12
2.2.2.3 Lignin .....	13
2.3 Metode predobrade lignocelulozne sirovine .....	15
2.3.1 Fizikalna predobrada.....	16
2.3.2 Fizikalno-kemijska predobrada.....	17
2.3.3 Kemijska predobrada .....	18
2.3.4 Biološka predobrada.....	18
<b>EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>19</b>
3.1 Materijali .....	20
3.1.1 Sirovine .....	20
3.1.2 Kemikalije.....	20
3.1.3 Aparatura i pribor.....	21
3.1.3.1 Mlin čekičar.....	21
3.1.3.2 HPLC uređaj.....	21
3.1.3.3 Sustav za predobradu sirovine.....	22
3.2 Metode.....	23
3.2.1 Priprema sirovine .....	23
3.2.2 Određivanje sastava početne sirovine dvostrukom kiselinskom hidrolizom .....	23
3.2.3 Predobrada lignocelulozne sirovine u visokotlačnom reaktoru .....	23
3.2.4 Određivanje ukupne suhe tvari u predobrađenoj sirovini .....	24

3.2.5	Određivanje udjela netopivog lignina u čvrstoj fazi hidrolizata .....	24
3.2.6	Određivanje topivog lignina u tekućoj fazi hidrolizata.....	24
3.2.7	Priprema standardne otopine i baždarnog dijagrama furana.....	25
3.2.8	Određivanje inhibitora fermentacije - ukupnih furana i kiselina .....	25
3.2.9	Izrada baždarnih dijagrama za određivanje fermentabilnih šećera u hidrolizatu lignocelulozne sirovine .....	25
3.2.10	Priprema uzoraka i određivanje koncentracije fermentabilnih šećera .....	26
<b>REZULTATI .....</b>		<b>27</b>
4.1	Određivanje sastava pšenične slame .....	28
4.2	Određivanje sastava hidrolizata pšenične slame dobivenog predobradom u visokotlačnom reaktoru kod različitih procesnih parametara .....	29
4.2.1	Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 10 minuta uz 1 %-tnu H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kao katalizator.....	29
4.2.2	Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 5 minuta 1 %-tnu H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kao katalizator.....	31
4.2.3	Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 1 minute uz 1 %-tnu H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kao katalizator.....	33
4.2.4	Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 5 minuta uz 0,5 %-tnu H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kao katalizator.....	35
4.3	Usporedba utjecaja vremena zadržavanja i koncentracije H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na sastav hidrolizata pšenične slame .....	38
<b>RASPRAVA.....</b>		<b>41</b>
5.1	Određivanje sastava pšenične slame .....	42
5.2	Određivanje sastava hidrolizata pšenične slame dobivenog kod različitih uvjeta predobrade u visokotlačnom reaktoru .....	43
5.2.1	Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 10 minuta uz 1 %-tnu H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kao katalizator.....	43
5.2.2	Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 5 minuta uz 1 %-tnu H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kao katalizator.....	44
5.2.3	Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 1 minute uz 1 %-tnu H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kao katalizator.....	45
5.2.4	Predobrada pšenične slame u visokotlačnom kod vremena zadržavanja od 5 minuta uz 0,5 %-tnu H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kao katalizator.....	46
5.3	Usporedba utjecaja vremena zadržavanja i koncentracije H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na sastav hidrolizata pšenične slame .....	47
<b>ZAKLJUČAK.....</b>		<b>50</b>
<b>LITERATURA .....</b>		<b>52</b>
<b>PRILOG .....</b>		<b>58</b>





## 1. UVOD

Goriva su tvari (plin, krutina ili tekućina) koje izgaraju da bi proizvele toplinu i energiju. Od ranih goriva kao što je drvo, čovječanstvo se kroz povijest oslanjalo na goriva za poboljšanje i održavanje kvalitete života (grijanje, kuhanje, zaštita, industrija itd.). Kasnih 1700-tih kovanje ugljena, proizvodnja ulja, zemnog plina (fosilna goriva) i drugih goriva više kalorijske vrijednosti od drva, označili su početak industrijske revolucije i masovne proizvodnje (Hinshaw i sur., 2014.). Kroz dvjestotinjak godina, materijali i metode crpljenja, odnosno iskorištavanja ovih vrsta goriva iznimno su se unaprijedili. Danas su 81,2 % ukupnih korištenih goriva fosilna goriva. Transport, industrija, ekonomija i samim time kvaliteta ljudskog života postala je usko vezana na dostupnost fosilnih izvora goriva (Schobert, 2013.; TWB, 2016.; Moan i sur., 2007.). Sa svjetskom populacijom od nešto više od 7,4 milijardi ljudi (Anonymous 2) i uvijek rastućom potrebom za naftom i ostalim fosilnim gorivima, nagađa se da takva praksa neće biti održiva u vremenu dužem od 200 godina za ugljen, a još kraći rok predviđa se za ostale izvore (Agarwal, 2007.). Zbog iscrpljivosti izvora ovih goriva, u svijetu se ukazala potreba za pronalaskom drugog, održivog rješenja ovog problema. Kako su za 76 % emisija CO<sub>2</sub> u atmosferi odgovorna fosilna goriva (EPA, 2010.), stvorio se globalni trend razvoja metoda za smanjenje stakleničkih plinova i efekata globalnog zatopljenja. Intenzivna istraživanja i napredak u razvoju solarnih ćelija i vjetroelektrana, kao i korištenje nuklearne energije smanjili su pritisak na eksploataciju fosilnih goriva, no ne nude rješenje goriva za primjenu u transportu zbog nemogućnosti primjene ili ekonomske neisplativosti u tom području (Pimentel, 2008.; Ashok, 2009.)

Biogoriva (bioetanol, biodizel, bioplin) su goriva proizvedena iz obnovljivih sirovina, koja su se pokazala obećavajućim kao zamjena i dodatak fosilnim gorivima u raznim područjima, pogotovo za primjenu u transportu, pošto 2/3 CO<sub>2</sub> emisija potječe upravo iz transporta (Wyman, 1996.). Biogoriva mogu biti tekuća, čvrsta ili plinovita i uglavnom se proizvode iz biljnih sirovina (bilo sirovina prehrambene industrije kao šećerna trska i kukuruz ili njihovih otpadaka), no među sirovine za proizvodnju se još ubrajaju biljna ulja, životinjsko gnojivo te životinjska mast I. i II. kategorije (otpadni proizvod prerade mesa koji nije namijenjen za ljudsku upotrebu ; EBTP, 2006.; Ashok, 2009.). Pažnju u razvoju biogoriva privlači upravo bioetanol kao dodatak klasičnim gorivima koji omogućuje bolje izgaranje zbog povišenja oktanskog broja goriva te smanjenje emisija CO<sub>2</sub> i smoga zbog dodavanja više kisika tijekom izgaranja. Bioetanol se dobiva fermentacijskim procesima iz biomase, koja se definira kao biorazgradivi dio proizvoda, otpada ili ostataka iz poljoprivrede, šumskog otpada te industrijskog i gradskog otpada (Rezić, 2012.). U današnje vrijeme bioetanol vlada tržištem

## 1. UVOD

te iznosi 94 % ukupnog svjetskog biogoriva sa SAD-om i Brazilom kao vodećim svjetskim proizvođačima (Jäger i sur., 2012.) Međutim, bioetanol se primarno proizvodi iz zrna kukuruza ili šećerne repe koji su ujedno i izvori hrane (1. generacija biogoriva) čime se povećava njihova cijena, a i činjenica da su potrebne velike površine za uzgoj kako bi proizvodnja bila isplativa dovodi u pitanje održivost ovakve sirovine za bioetanol kao i legitimitet bioetanola kao zelenog goriva.

Iz gore spomenutih razloga te drugih socioekonomskih i političkih razloga, istraživanje biogoriva se okreće prema lignoceluloznim izvorima. Lignocelulozna biomasa sastoji se od celuloze, lignina i hemiceluloze (Tabac, 2009.) te se može sagledati kao otpadna sirovina poljoprivrede i nekih industrijskih procesa (Rezić, 2012.). Pošto ona čini veliki postotak otpada spomenutih industrija, predstavlja nov i održiv način zbrinjavanja otpada bez negativnih utjecaja na druga tržišta (Mabee i sur., 2008.)

## **TEORIJSKI DIO**

### 2.1 Biogoriva

#### 2.1.1 Općenito o biogorivima

Biogoriva su jednostavna za korištenje, biorazgradiva, obnovljiva i netoksična za okoliš i ljude. Pojam biomasa podrazumijeva obnovljive izvore energije te u smislu proizvodnje biogoriva obuhvaća bilo kakav biljni otpad (Ashok, 2009.). Dijeli se na drvenu biomasu, biomasu energetskih usjeva (brzo rastuće drveće), nedrvnu (alge i trave) i na otpatke iz poljoprivrede (slama, šećerne i škrobne sirovine ; Rezić, 2012.). Ovisno o tipu korištene biomase, biogoriva se mogu podijeliti u tri glavne skupine: biogoriva prve generacije - šećerne i škrobne sirovine, biogoriva druge generacije - lignocelulozna biomasa te biogoriva treće generacije - iz biomase algi (Mabee i sur., 2008.).

##### 2.1.1.1 Biogoriva prve generacije

Sirovine za proizvodnju biogoriva prve generacije odnose se primarno na biljnu biomasu koja je ujedno i izvor ljudske i životinjske hrane. Šećerne sirovine su podrijetlom iz šećerne trske i repe, dok su škrobne većinom iz žitarica kao što su kukuruz i pšenica (Walker, 2012.). Od sirovina, šećerna repa i trska imaju najveći potencijal upravo zbog svojih lako dostupnih šećernih komponenti. Kako one uključuju fruktozu i glukozu (monosaharidi) te saharozu i druge disaharide, fermentacija u etanol se može provoditi uz minimalnu prethodnu obradu. Sirovina se samelje do željene veličine, kako bi joj se povećala površina za razgradnju enzimima te se u nekim slučajevima dodaju enzimi koji započinju razgradnju do jednostavnih šećera (Schobert, 2013.). Enzimski sustavi mikroorganizama (invertaze kod triju najčešće korištenih mikroorganizama: kvasca, *E. coli* i *Z. mobilis*) lako razgrađuju saharozu na glukozu i fruktozu te ih fermentiraju u alkohol i CO<sub>2</sub> (Balcu i sur., 2011.; Kennedy J. F. i sur., 2006.). Škrobne sirovine kao kukuruz i pšenica sadrže visoki udjel škroba kojeg je potrebno procesima želatinizacije, likvefakcije i ošećerenja enzimski ili kiselinski razgraditi do glukoznih komponenti kako bi ih mikroorganizmi mogli upotrebljavati (Lazić i sur., 2004.). Potreba za enzimima i precizno kontroliranje uvjetima kiselinske hidrolize čine ovaj proces fermentacije škrobnih sirovina dugotrajnijim i skupljim u usporedbi s proizvodnjom iz šećernih sirovina. Međutim, usprkos nekim nedostacima, proizvodnja biogoriva prve generacije i dalje predstavlja, iako neetičko i možda nemoralno, najisplativije rješenje smanjenja upotrebe fosilnih goriva unutar sve tri generacije biogoriva (Walker, 2010.).

## 2. TEORIJSKI DIO

Upravo se iz ovih razloga najviše proizvode goriva iz kukuruza (SAD ; AFDC, 1991.), pšenice (Europa ; IBTS, 2006.) te šećerne repe ili trske (Brazil ; GAIN, 2003.).

### 2.1.1.2 Biogoriva druge generacije

Kad bi SAD zamijenio sav benzin s 10 %-tnim etanolom, 46 % svih kukuruznih usjeva bi bilo korišteno za proizvodnju biogoriva (Walker, 2010.). Činjenica da se koriste velike količine sirovina za proizvodnju značajnijih količina biogoriva, ne daje prednost biogorivima proizvedenim iz šećernih i škrobnih sirovina (prva generacija). Iz tog su se razloga za proizvodnju biogoriva počele koristiti sirovine druge generacije. Ovakve sirovine ne uključuju prehrambenu biomasu (žitarice) već primarno lignocelulozne ostatke poljoprivredne industrije (kukuruzovina, slama, ostatke u preradi šećerne trske) i šumsku biomasu. Sama sirovina je jeftina i dostupna u velikim količinama što smanjuje potrebu za posebnim zbrinjavanjem. Međutim, ograničavajući faktor pri proizvodnji biogoriva iz lignoceluloznih sirovina je zahtjevna predobrada koja prethodi fermentaciji. Razlog tome jest kompleksna i otporna struktura lignoceluloznih sirovina koja se sastoji od promjenljivih udjela celuloze, hemiceluloze i lignina, koju je potrebno razgraditi da bi se dobio lako fermentabilni supstrat. Ukoliko se u predobradi koriste kemikalije kao kiseline ili baze, postiže se bolja razgradnja sirovine, no sam proces može dovesti do nastanka nusprodukata razgradnje koji mogu inhibirati i tako usporiti proces (organske kiseline i ketoni), dodatno otežavajući predobradu i fermentaciju ovakvih sirovina do etanola. Za razliku od biogoriva prve generacije iz šećernih i škrobnih sirovina, biogoriva druge generacije ne utječu na porast cijene prehrambenih proizvoda i samim time ne pridonose ekonomskim i posljedično tome društveno - političkim nestabilnostima kako razvijenih tako i nerazvijenih regija svijeta, no dodatni postupci u proizvodnji ipak poskupljuju proces (Blaschek i sur., 2010.).

### 2.1.1.3 Biogoriva treće generacije

Biogoriva ovog tipa baziraju se na korištenju do sad još relativno novog izvora u ovom području, algi. Alge čine koncept proizvodnje biogoriva iz biomase zanimljivim zbog činjenice da kultivacija u ovu svrhu nije zahtjevna te da su prinosi mnogo veći u usporedbi s kopnenim biljkama (Eijsink i sur., 2012.). One također mogu koristiti razne izvore ugljika te mogu rasti čak i u otpadnim vodama (Anonymous 3, 2010.; Arora i sur., 2015.). Alge predstavljaju raznoliku skupinu prokariotskih i eukariotskih, jednostaničnih i višestaničnih

## 2. TEORIJSKI DIO

organizama različite kemijske strukture (Arora i sur., 2015.). Smeđe alge (Phaeophyta) sadrže visoke udjele ugljikohidrata kao alginata (30 - 40 % suhe tvari), laminarina ili manitola koji se relativno lagano mogu konvertirati u fermentabilne šećere i koristiti za proizvodnju bioetanol (Eijsink i sur., 2012.). Međutim, pokušaj korištenja algi kao sirovine za proizvodnju biogoriva većinom je zaustavljen 2013. nakon 200.000 ispitanih sojeva algi i utrošenih 100 milijuna USD u četverogodišnjem zajedničkom istraživanju kompanija Exxon mobil i Synthetic Genome uz zaključak da biogoriva proizvedena iz algi neće biti ekonomski isplativa još 25 godina (Anonymous 4, 2016.).

### 2.1.2 Bioetanol

Bioetanol je, za razliku od etanola proizvedenog iz petrokemijskih sirovina, alkohol nastao anaerobnim procesom fermentacije jednostavnih šećera pomoću mikroorganizama, od kojih su se najuspješnijima pokazali kvasac *Saccharomyces cerevisiae* te bakterije *Escherichia coli* i *Zymomonas mobilis* (Dien, 2003.). Molekulske formule  $C_2H_5OH$  i molekulske mase od  $46,07 \text{ g mol}^{-1}$  etanol je bezbojna, lako hlapiva, zapaljiva tekućina karakterističnog mirisa sa ledištem pri  $-117 \text{ }^\circ\text{C}$  i vrelištem pri  $78 \text{ }^\circ\text{C}$  koja se lako miješa s vodom. Pripada alkoholnoj skupini organskih spojeva s karakterističnom hidroksilnom skupinom (Wyman, 1996.).

Bioetanol predstavlja najveći volumetrijski udjel svih goriva proizvedenih biološkim procesima, s godišnjom proizvodnjom od 100 milijardi litara (od tog su najveći SAD s 50 milijardi i Brazil s 35 milijardi litara godišnje). Visok oktanski broj (99 - mjera otpornosti goriva na predizgaranje) čini etanol pogodnim za veću kompresiju (ukoliko se koristi u motorima kao mješavina s benzinom) što za posljedicu ima veću snagu i manju potrošnju (10 - 20 %) u usporedbi s klasičnim benzinom. Osim kao gorivo u automobilima i nekim lakim zrakoplovima, anhidridni oblik etanola se koristi u sintezi terc-butil-etil etera (dodatak gorivima) i polietilen tereftalata (PET) za proizvodnju ambalaža (Walker, 2010.). U medicini se etanol koristi kao antiseptik i protuotrov pri trovanju metanolom i etilen glikolom, dok ga dobra polarnost čini vrlo pogodnim organskim otapalom u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Kao prekursor, etanol se koristi u sintezi octene kiseline i acetaldehida, a u novije vrijeme u sintezi jednostjenčanih ugljikovih nanocjevčica koje imaju potencijal u proizvodnji električne energije (Mayatulikhma i sur., 2013.).

## 2. TEORIJSKI DIO

Kako se bioetanol proizvodi iz uzgojene biomase, a njegovim se izgaranjem oslobađa tek dio CO<sub>2</sub> oslobođenog izgaranjem fosilnih goriva, on se može smatrati CO<sub>2</sub> neutralnim gorivom koje ne pridonosi emisiji stakleničkih plinova. Međutim, proizvodnja bioetanola iz primarnih sirovina nije održiva jer zahtjeva veliku površinu za uzgoj kultura što se prema nekim autorima osigurava krčenjem šuma (Gao i sur., 2011.). Trendovi u biotehnološkoj proizvodnji biogoriva ukazuju na sve veću popularnost korištenja sekundarnih sirovina. Lignocelulozna biomasa čini tek manji postotak ukupne cijene bioetanola proizvedenog iz ovih sirovina (manje od 40 %), za razliku od bioetanola dobivenog iz primarnih sirovina (oko 80 % ; Walker, 2010.). Zato proizvodnja iz sekundarnih sirovina uz unapređenje biotehnoloških i kemijskih metoda ima potencijal za smanjenje troškova proizvodnje (s otprilike 0,5 USD/dm<sup>3</sup> na 0,12 - 0,36 USD/dm<sup>3</sup>, dok se kod šećerne trske trošak kreće od 0,18 - 0,32 USD/dm<sup>3</sup>) uslijed povećanog iskorištenja cjelokupnog procesa.

### 2.1.3 Biobutanol

Butanol je bezbojni, zapaljivi alkohol kemijske formule C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O i molekulske mase 74,12 g mol<sup>-1</sup> sa ledištem od -89,8 °C i vrelištem od 117,7 °C (Dürre, 2007.). Biobutanol se proizvodi u acidogenskom putu bakterija od kojih se najčešće koriste *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii* i *C. saccharoperbutylacetonicum* (Liu i sur., 2013.).

Butanol kao gorivo ima značajan broj prednosti kao što su mogućnost korištenja u čistom obliku ili kao mješavina s benzinom, nepotrebna modifikacija postojećih motora kako bi koristili butanol, visoki oktanski broj i smanjena emisija NO<sub>x</sub> pri sagorijevanju (Black i sur., 2007.), visoka viskoznost, nizak tlak para, manja korozivnost u odnosu na mješavinu etanola i benzina i visoki energetska sadržaj. Osim kao nadomjestak benzinu, butanol se koristi i kao otapalo u proizvodnji boja, ekstraktant u sintezi antibiotika, hormona i vitamina, dodatak sredstvima za čišćenje, sastojak u parfemima te kao intermedijer u proizvodnji butilakrilata i butil-acetata (sintetski okus voća ; Gupta i sur., 2013.).

Iako se klasično proizvodi anaerobnim ABE procesom iz šećernih sirovina u kojem su uz butanol sintetizirani još aceton i etanol, cijena procesa, nizak prinos i inhibicija procesa produktom spriječili su značajan prodor biobutanola na tržište zbog nemogućnosti takmičenja sa sintetički proizvedenim butanolom (Oxo procesom ; EBTP, 2006.). Da bi biobutanol mogao biti konkurentan potrebno je promijeniti tip sirovine (proizvodnjom iz lignoceluloznih materijala zbog manje cijene), ubrzati ABE proces te smanjiti troškove svakog stupnja



## 2. TEORIJSKI DIO

procesa (García i sur., 2011.). Otkrićem soja klostridija TU - 103 moguće je smanjiti stupanj predobrade lignoceluloznih sirovina na samo mehaničko usitnjavanje zbog mogućnosti bakterije da razgradi ovakav tip sirovine uz normalne prinose butanola (Anonymous 5, 2011.) i tako smanjiti cijenu proizvodnje. Biobutanol se trenutno proizvodi u SAD-u, UK-u, Kini, Kanadi i Švicarskoj te se cijena proizvodnje kreće oko 0,28 USD/dm<sup>3</sup> (Ramey i sur., 2004.).

### 2.1.4 Biodizel

Biodizel je smjesa metil ili etil estera dobivenih transesterifikacijom masnih kiselina podrijetlom iz biljnih i životinjskih masti i ulja s niskomolekulskim alkoholima. Ovakav proizvod ima fizikalno - kemijske karakteristike kao gustoću, viskoznost, hlapivost i cetanski broj (sklonost prema samozapaljenju) puno sličnije klasičnim gorivima nego drugim biogorivima (Mousdale, 2008.). Samim time, biodizel se može miješati u raznim omjerima s klasičnim dizelom i upotrebljavati u dizelskim motorima bez potrebe za ikakvom modifikacijom motora (najčešće u omjeru do 20 %). Čisti biodizel (100 %-tni) je netoksičan, biorazgradiv te se spaljivanjem oslobađa 86 % manje stakleničkih plinova (osim NO<sub>x</sub>) u usporedbi s dizelom proizvedenim iz nafte (Anonymous 6, 2016.; EPA, 1970.). Dok je za potrebe čuvanja bioetanola potrebno preinačiti postojeće tankove, što doseže cijene od 100 000 USD po tanku, biodizel se može čuvati kao klasično gorivo i ne zahtjeva posebnu infrastrukturu (Ashok, 2009.). S druge strane, kristalizacija biodizela pri niskim temperaturama može začepiti filtere motora što ga čini neprihvatljivim kao čisto gorivo. Isto tako, kvaliteta biodizela ovisi o vrsti žitarice korištene za proizvodnju, gdje se postiže ujednačenija kvaliteta uzgojem vrsta u monokulturi što može učiniti žitaricu više podložnom parazitima i bolestima (Demirbas, 2008.).

Trenutno se u SAD-u biodizel najviše proizvodi iz sojinog ulja te je 2014. godišnja proizvodnja nadmašila 4,5 milijardi litara, što je pola milijarde litara manje nego u 2013 (USDE, 1991.). Međutim, zbog povećane potražnje za sojinim uljem u prehrambenom sektoru, cijena litre biodizela veća je za 0,20 USD u odnosu na prošlu godinu te iznosi 0,88 USD/dm<sup>3</sup> što je više od dva puta skuplje od bioetanola. (USDA, 2016.).

### 2.1.5 Bioplin

Iako je bioplin primarno smjesa metana ( $\text{CH}_4$ ) i ugljikovog dioksida ( $\text{CO}_2$ ) u relativnom omjeru 70:20, ovisno o sirovini iz koje se proizvodi u njemu mogu biti prisutni sumporovodik ( $\text{H}_2\text{S}$ ), dušik ( $\text{N}_2$ ) i vodik ( $\text{H}_2$ ; Abbasi i sur., 2011.). Bioplin nastaje anaerobnom razgradnjom organskog materijala metanogenom fermentacijom iz spojeva koji sadrže metilnu skupinu (npr., acetat i amini) i  $\text{H}_2$  te iz  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2$ . Bakterije odgovorne za ove reakcije pripadaju skupini metanogenih bakterija i uključuju *Methanococcus sp.*, *Methanosarcina sp.* i *Methanospirillum sp.* (Dragičević, 2015.). Supstrati za metanogene bakterije variraju od poljoprivrednih ostataka, kućnog organskog otpada i algi, do otpadne vode i gnojiva. Sam kemijski proces razgradnje organskih sastojaka do metana se odvija i prirodno u probavnom traktu preživača, a metanogene bakterije mogu biti prisutne u močvarama i u rudnicima gdje reduciraju  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2$  do metana (Dragičević, 2015.).

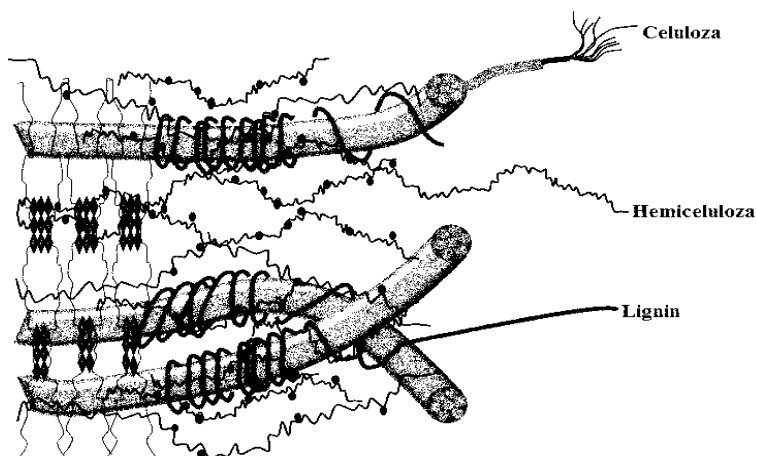
Prednost bioplina, osim što je obnovljiv izvor energije i ne zagađuje okoliš, je u tome što se njegovom proizvodnjom potpomaže čišćenje okoliša i voda (čvrsti i tekući otpad su supstrati). Iako se većina energije potrebne za proizvodnju uglavnom troši na održavanje odgovarajućih uvjeta za mikroorganizme, proizvedeni bioplin se može također koristiti u tu svrhu, kao gorivo za zagrijavanje postrojenja ili proizvodnju energije, čime se dalje smanjuje trošak proizvodnje (Anonymous 7, 2009.). Tekući biometan djeluje i kao potencijalno gorivo za automobile (IGU, 2015.).

S druge strane, problemi prijenosa procesa u veće mjerilo, nečistoće i nestabilnost plina dovode u pitanje prikladnost i ekonomičnost korištenja bioplina (Nijaguna, 2002.). Trenutno je najveći svjetski proizvođač bioplina Njemačka sa 10 786 bioplinara (EBA, 2015.) koje godišnje proizvode oko 27 TWh struje, dok Švedska predvodi u proizvodnji biometana kao tekućeg goriva (1,303 GWh u 2014. ; Wagner, 2015.).

## 2.2 Lignocelulozna biomasa

### 2.2.1 Općenito o lignoceluloznoj biomasi

Pod pojmom lignocelulozna biomasa podrazumijeva se biomaterijal preostao nakon prerade drva i proizvodnje papira (komadići drva, piljevina, papirna pulpa), poljoprivredni materijal (ostaci slame, kukuruzovina i kukuruzni oklasci) te čvrsti gradski otpad. U kontekstu proizvodnje bioetanola, lignocelulozna biomasa se odnosi prvenstveno na drvenu biomasu (biljke i drveće). Ona se sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina, molekulskih formula  $C_6H_{10}O_5$ ,  $C_5H_8O_4$  i  $C_6H_{11}O_2$  (Walker, 2010.; Emptage i sur., 2006.), čiji se udjel komponenti u biomasi razlikuje ovisno o sirovini iz koje potječe. Dok se celuloza i hemiceluloza mogu hidrolizirati do fermentabilnih šećera i iskoristiti u proizvodnji bioetanola, lignin nije moguće prevesti u supstrat za fermentaciju (Walker, 2010.).



Slika 1. Shematski prikaz stanične stjenke lignocelulozne sirovine (Doshi i sur., 2016.)

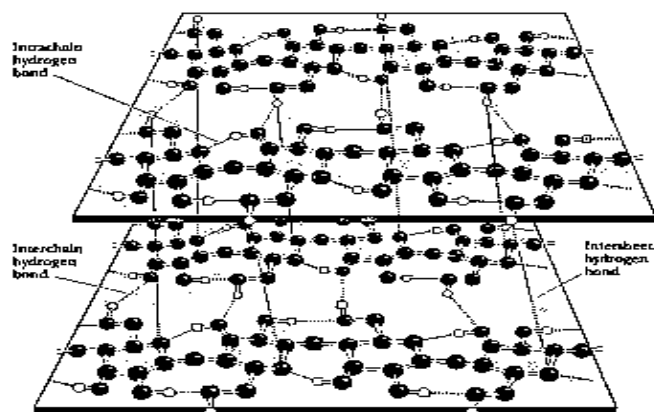
### 2.2.2 Sastav

#### 2.2.2.1 Celuloza

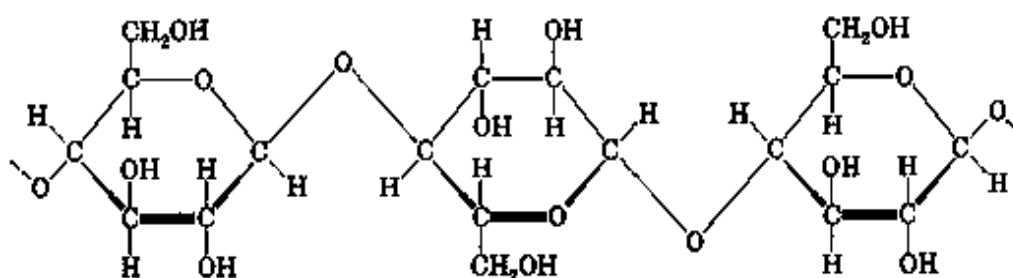
Celuloza je glavna strukturalna komponenta staničnog zida biljaka, ujedno i najzastupljeniji prirodni polimer koji čini 40 - 50 % ukupne suhe mase biomase. Homopolisaharid je ponavljajućih  $\beta$ -D-glukopiranoznih jedinica povezanih preko hidroksilnih skupina C1 i C4 atoma  $\beta$ -glikozidnim vezama (Hadar, 2013.; Bajpai, 2016.) s prosječnom molekulskom masom od 100 000 Da. Celuloza je polimer sastavljen od lanaca glukoznih jedinica koje tvore kontinuirani lanac celuloze, povezanih u kristalične ploče, što je moguće

## 2. TEORIJSKI DIO

zbog linearnog strukturnog karaktera. Zajedno, celulozni lanci (20 - 300) povezani su u mikrovlakna koja povezana tvore celulozna vlakna (Bajpai, 2016.). Važnost vodikovih veza ovdje dolazi do izražaja jer su upravo preko njih celulozne molekule povezane u slojeve koji su opet međusobno povezani vodikovim mostovima preko hidroksilnih skupina monomera (glukoze ; Navi i sur., 2012.). Celulozna vlakna obavijena su hemicelulozom.



Slika 2. Shema celulozних slojeva (Anonymous 1, 2013.)



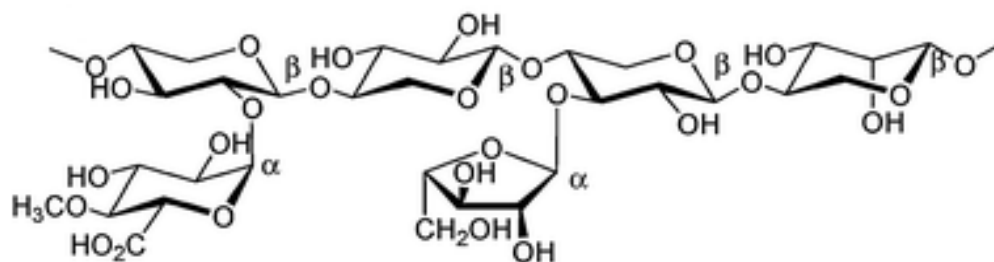
Slika 3. Molekulska struktura celuloze (Anonymous 1, 2013.)

### 2.2.2.2 Hemiceluloza

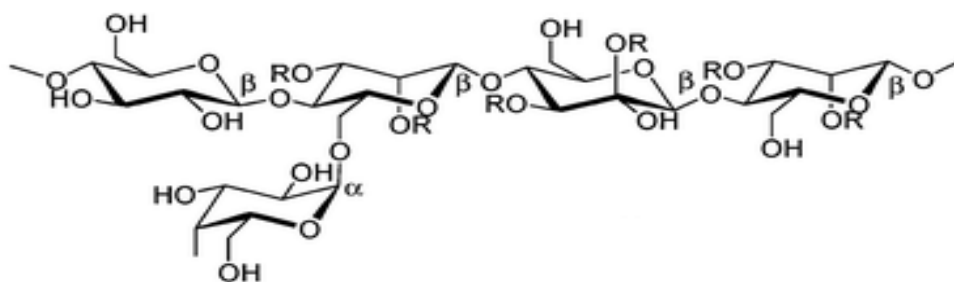
Hemiceluloza je prirodni polimer, kemijski vrlo različit od celuloze te čini 20 - 35 % mase suhe tvari. Visoko je razgranati hetero-polisaharid molekulske mase ispod 50 000 Da (Wyman, 1996.). Sastoji se od pentoznih šećera - ksiloza i arabinoza; i heksoza - glukoza, manosa i galaktoza. Tip prisutnih šećera ovisi o vrsti sirovine, a najrašireniji oblik je ksilan (Bajpai, 2016.; Schobert, 2013.). Glavni lanac hemiceluloze se može sastojati od samo jednog tipa monomera (npr. ksilana) ili različitih jedinica (npr. glukomanana, glukoza+manosa). Tako se okosnica ksilan hemiceluloze sastoji od 1,4- $\beta$ -D-ksilopiranoze povezanih 1,4-

## 2. TEORIJSKI DIO

glikozidnim vezama, dok pobočni ogranci mogu sadržavati 4-O metilglukuronsku kiselinu (uvijek prisutnu) ili galaktozu (Chen, 2014.). Razgranatost hemiceluloze čini strukturu amorfnom, zbog čega se ona lakše hidrolizira kiselinom nego celuloza (Hadar, 2013.; Anonymous 1, 2013.). Hidrolizom ovih polimera dobiju se glukoza i ksiloza koje se mogu fermentirati u etanol.



**Slika 4.** Struktura ksilana (Hamid i sur., 2014.)



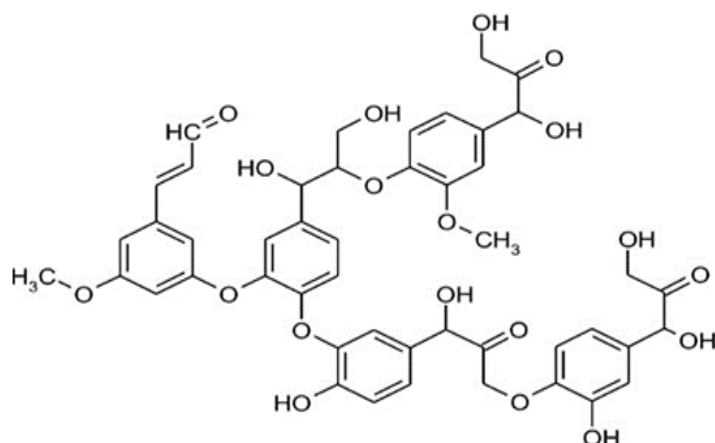
**Slika 5.** Struktura glukomanana kao pobočnog lanca (Hamid i sur., 2014.)

### 2.2.2.3 Lignin

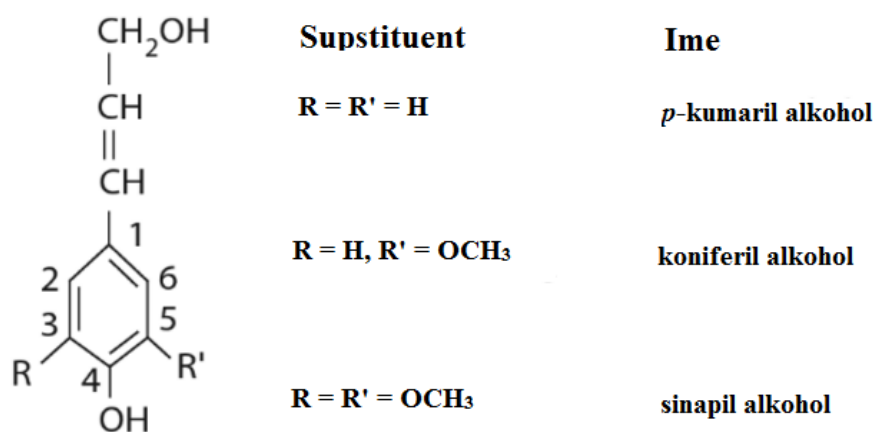
Lignin je kompleksni polimer, visoke molekulske mase koji doprinosi mehaničkoj čvrstoći drvenastih biljaka i otpornosti protiv patogena unakrsno povezujući sekundarni stanični zid lignoceluloznih sirovina. Tvori zaštitni sloj oko molekula celuloze i hemiceluloze te ih štiti od razgradnje. Lignin se sastoji od 3D mreže hidrosiliranih, mono- i dimetoksiliranih te nemetoksiliranih derivata fenilpropanskih jedinica koji se razlikuju u supstituentima na 3. i 5. poziciji (Slika 7.), odnosno *p*-kumaril, koniferil te sinapil alkohola (Dimmel i sur., 2010.; Schobert, 2013.). Kao i celuloza i hemiceluloza, postotak lignina u staničnom zidu varira između različitih tipova biljaka (čini otprilike 15 - 20 % mase suhe

## 2. TEORIJSKI DIO

tvari) i značajno smanjuje djelotvornost razgradnje celuloze i hemiceluloze (Bajpai, 2016.). Iako je netopiv i otporan na djelovanje kemikalija, štiteći na taj način celulozu i hemicelulozu od enzimske razgradnje, lignin se može ukloniti iz sirovine procesom predobrade (Ćurić i sur., 2008.). Takav se može koristiti kao makromonomer u proizvodnji poliuretana i poliestera procesom polikondenzacije alifatskih i fenolnih hidroksilnih skupina (Hu, 2002.). Lignin ima raznovrsnu svrhu u industriji te se koristi kao efektivno ljepilo pri proizvodnji biorazgradive plastike, keramike i stakloplastike, kao dodatak cementu za smanjenje udjela vode i kao emulsifikator u pesticidima i bojama (Stewart, 2008.).



**Slika 6.** Struktura lignina (Dimmel i sur., 2010.)



**Slika 7.** Monomeri lignina (Dimmel i sur., 2010.)

**Tablica 1.** Detaljan sastav pšenične slame prema Boe i sur. (2007.)

Komponenta	Udjel (%) [w/w]
Glukan	37,5
Ksilan	21,7
Arabinan	2,7
Galaktan	1,6
Manan	0,6
Lignin topiv u kiselini	2,9
Lignin netopiv u kiselini	16,4
Proteini	4,7
Pepeo	6,3

### 2.3 Metode predobrade lignocelulozne sirovine

Među problemima proizvodnje biogoriva je održivost procesa fermentacije sirovina u bioetanol. To uključuje odabir pogodnog tipa sirovine (šećerna ili lignocelulozna), odabir izvora sirovine i metodu proizvodnje. Idealno, proizvodnja biogoriva trebala bi uključivati lignoceluloznu sirovinu, lako dostupnu, visokog prinosa, s visokim udjelom celuloze i minimalnim udjelom lignina (Hadar, 2013.). Ovakva sirovina bila bi jeftina i lako razgradiva te bi uz odgovarajuću metodu predobrade osiguravala visoku koncentraciju šećera za fermentaciju. Ostali kriteriji uključuju dugoročnu dostupnost sirovine ujednačene kvalitete, tržišnu cijenu sirovine, vrstu organizma, ekonomsku isplativost procesa i potrebnu infrastrukturu (Rezić, 2012.)

Predobrada je proces kojim se lignocelulozna biomasa prevodi iz prirodnog oblika, nepristupačnog celulazama, u oblik na kojem je moguća enzimska hidroliza (Ashok, 2009.). Netretirana biomasa je strukturno vrlo otporna na djelovanje enzima zbog svoje kristaličnosti, prisutnosti lignina te moguće acetilacije ksiloze u hemicelulozi (hidrolizom se dobiju produkti koji inhibiraju proces fermentacije). Neke vrste gljiva iskazale su znatnu mogućnost uklanjanja lignina prilikom predobrade te se zbog ekonomskih i ekoloških razloga koriste kao zamjena za fizikalne/kemijske procese predobrade (Dumonceaux i sur., 2013.). Pogodnim odabirom metode predobrade se generalno nastoji ukloniti lignin, smanjiti kristaličnost celuloze, povećati poroznost sirovine, povisiti mogućnost nastanka šećera hidrolizom

## 2. TEORIJSKI DIO

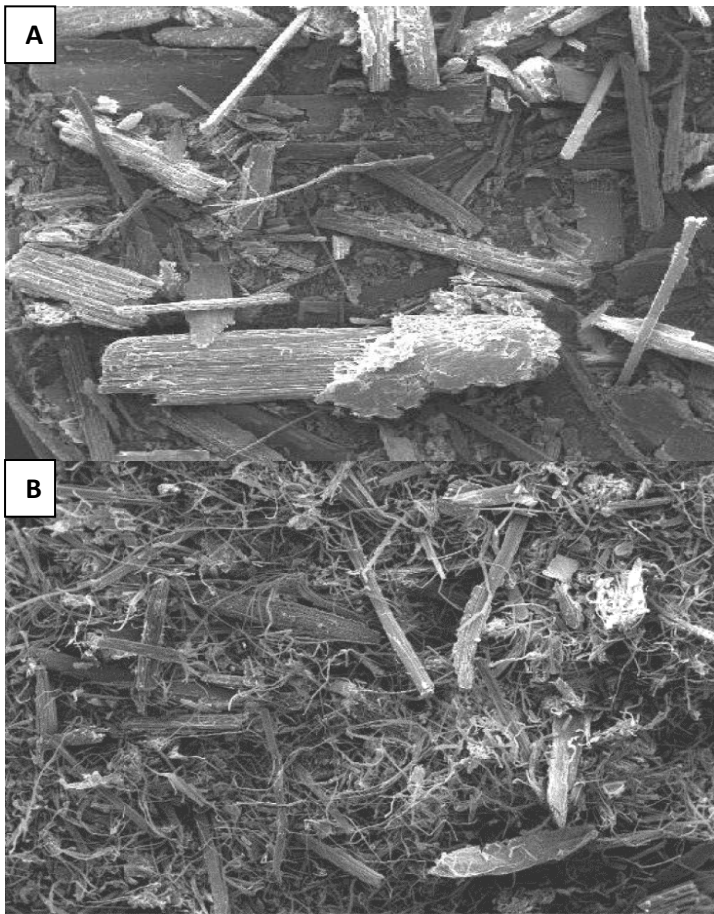
sirovine, izbjeći gubitak ugljikohidrata i nastanak inhibitora uslijed razgradnje (Barrett i sur., 2009.).

Postoji široki raspon metoda predobrade, a na tip obrade direktno utječe željeni sastav hidrolizata lignocelulozne biomase. Općenito, metode predobrade se dijele na fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke metode. Alternativna podjela klasificira ih prema tipu faze u kojoj se nalaze celuloza, hemiceluloza i lignin, (i) sve tri komponente u jednoj fazi; (ii) hemiceluloza u tekućoj fazi, a celuloza i lignin u čvrstoj fazi; (iii) lignin i hemiceluloza u tekućoj fazi, celuloza u čvrstoj fazi; i (iv) sve tri komponente u drugačijim fazama (Wyman, 1996.).

### 2.3.1 Fizikalna predobrada

Fizikalnom predobradom se osigurava povećanje kontaktne površine i pora sirovine za djelovanje enzima, smanjenje stupnja polimerizacije te se ujedno smanjuje kristalična struktura celuloze uslijed hidrolize i djelomično (ili potpuno) razgrađuje hemiceluloza (Bajpai, 2016.). Metode fizikalne predobrade uključuju mljevenje, zračenje (gama zrake, ultrazvuk i UV), ekstruziju, ekspanziju, pirolizu, obradu parom i SO<sub>2</sub> (Ashok i Barrett, 2009.). Nedostaci metoda fizikalne predobrade sirovina su velike varijacije cijene i uspješnosti same predobrade te smanjeno uklanjanje lignina u usporedbi s ostalim metodama (Mousdale, 2008.; Ashok, 2009.; Barrett i sur., 2009.).





**Slika 7.** Mikroskopska slika pšenične slame, A) prije predobrade i B) nakon predobrade (Jäger i sur., 2012.)

### 2.3.2 Fizikalno-kemijska predobrada

Fizikalno-kemijska predobrada obuhvaća eksploziju vodenom parom ili  $\text{CO}_2$ , te obradu vrućom vodom i amonijakom. Prednosti ovog tipa predobrade uključuju minimalnu nužnu uporabu kemikalija (ukoliko se sama predobrada ne vrši kao kombinacija npr. eksplozije vodenom parom uz dodatak kiseline kao katalizatora razgradnje) i niže energetske troškove u usporedbi s fizikalnim metodama, dok su joj nedostaci nepotpuno uklanjanje lignina kod sirovina s višim postotkom lignina i mogućnost pojave inhibitora fermentacije ovisno o intenzitetu predobrade (Bajpai, 2016.; Barrett i sur., 2009.).

### 2.3.3 Kemijska predobrada

Oksidativna delignifikacija vodikovim peroksidom, ozonom ili kisikom, obrada kiselinom/lužinom su samo neke od kemijskih metoda predobrade kojima se postiže povećanje kontaktne površine, efektivno uklanjanje lignina, hemiceluloze i smanjenje stupnja polimerizacije (Ashok, 2009.). Kemijskom predobradom se postiže vrlo uspješna razgradnja lignocelulozne sirovine, no korištenje agresivnih kemikalija, njihova cijena i potreba za neutralizacijom sirovine nakon predobrade dodatno tehnološki i ekonomski opterećuju proces (Rezić, 2012.).

### 2.3.4 Biološka predobrada

Cilj biološke predobrade sirovina je korištenje mikroorganizama (fungi i bakterija) za hidrolizu lignoceluloznog supstrata što osigurava delignifikaciju, hidrolizu celuloze i smanjenje stupnja polimerizacije. Najčešće se koriste gljive bijele truleži (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Cyathus stercoreus*), koje uglavnom razgrađuju celulozu i lignin, i smeđe truleži (*Coniphora puteana*, *Postia placenta*), koje uglavnom razgrađuju celulozu (Barrett i sur., 2009.). Gljive bijele truleži su se pokazale najboljima u razgradnji lignoceluloznih sirovina (Fan, 2011.), a razgradnja se odvija pomoću specifičnih peroksidaza i lakaza. Istraživanja se usmjeravaju prema genetskom modificiranju ovih tipova gljiva kako bi se spriječila nepotrebna razgradnja holoceluloze (celuloza i hemiceluloza) i poboljšala specifičnost razgradnje lignina (Carrere i sur., 2015.). Od bakterija se koriste *Zymomonas mobilis* i bakterije iz porodice *Lactobacillaceae*. Singh i sur. (2008.) istraživali su efektivnost razgradnje ostataka šećerne trske bakterijama i gljivama te ih uspoređivali na temelju C/N omjera potrebnog za razgradnju. Omjer C/N važan je parametar u predobradi jer o njemu ovisi uspješnost razgradnje lignocelulozne sirovine. Gljive imaju veći C/N omjer (30:1) od bakterija (10:1), što znači da su općenito sposobnije razgrađivati lignocelulozne sirovine zbog manje ovisnosti metabolizma o dušiku (Carrere i sur., 2015.). Prednosti ovih metoda su mali utrošak energije u usporedbi s fizikalnim i fizikalno kemijskim metodama, efikasnost predobrade, odsutnost agresivnih kemikalija koje bi mogle oštetiti opremu i mali utjecaj na okoliš (Arora i sur., 2012.; Barrett i sur., 2009.).

## **EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

## 3.1 Materijali

### 3.1.1 Sirovine

Lignocelulozna biomasa korištena u ovom radu bila je pšenična slama s 92,8 % suhe tvari, podrijetlom iz Hrvatskog Zagorja.



**Slika 8.** Pšenična slama usitnjena mlinom čekičarom

### 3.1.2 Kemikalije

**Tablica 2.** Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripremu otopina i standarda korištenih u eksperimentima

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
celobioza	p.a.	Molekula, UK
glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
ksiloza	≥99 %, za biokemiju	Roth, Njemačka
arabinoza	za mikrobiologiju	Kemika, Hrvatska
levulinska kiselina	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
octena kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
mravlja kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
furfural	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
demineralizirana voda	p.a.	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
fosfatna kiselina	p.a., za HPLC	Fluka, Njemačka
kalcijev hidroksid	p.a.	Kemika, Hrvatska
sumporna kiselina	min. 96 %, p.a.	Kemika, Hrvatska
Ca(OH) <sub>2</sub>	50 %, tehnički	Proizvodnja gašenog vapna, Hrvatska

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1.3 Aparatura i pribor

##### 3.1.3.1 Mlin čekičar

Za usitnjavanje lignocelulozne sirovine korišten je mlin čekičar – tip NA45. Mlin pokreće trofazni motor. Kapacitet mljevenja u zrnju iznosi  $300 \text{ kg h}^{-1}$ , a kapacitet mljevenja u klipu iznosi  $250 \text{ kg h}^{-1}$ . Za usitnjavanje pšenične slame korišteno je sito veličine 5 mm.



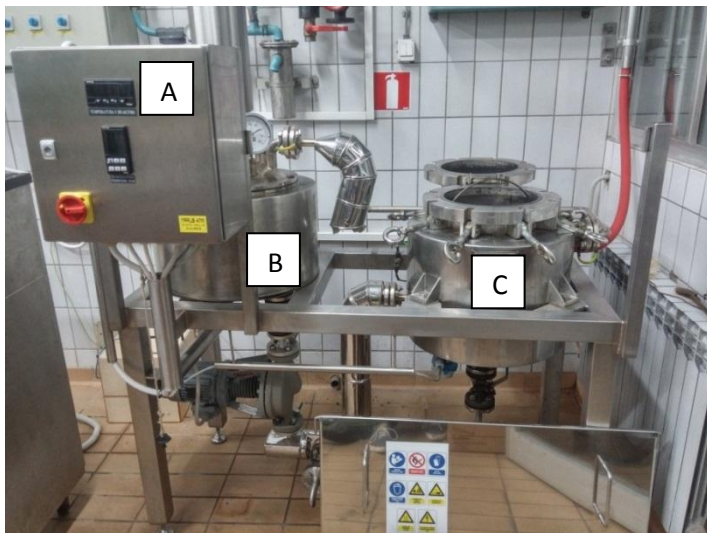
**Slika 9.** Mlin čekičar – tip NA45 (Megamet d.o.o., Nedelišće, Hrvatska)

##### 3.1.3.2 HPLC uređaj

HPLC uređaj Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> korišten je za određivanje koncentracije fermentabilnih šećera u tekućoj i čvrstoj fazi. Sastoji se od pumpe (LC-10A<sub>VP</sub>), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10A<sub>VP</sub>), termostata (CTO-10A<sub>VP</sub>), RID-10A detektora indeksa loma, kontrolera sustava (SCL-19A<sub>VP</sub>) i računalnog programa za kromatografiju za ovaj tip uređaja (v6.10). Korištena kolona je bila ionsko-izmjenjivačka analitička kolona (Supelcogel<sup>TM</sup> C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s Supelcogel<sup>TM</sup> H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm predkolonom.

#### 3.1.3.3 Sustav za predobradu sirovine

Sustav za predobradu sastoji se od spremnika za zagrijavanje termičkog ulja spojenog pomoću cijevi na visokotlačni reaktor, visokotlačnog reaktora i kontrolne ploče. Kontrolnom pločom se namjesti temperatura zadržavanja (210 °C) te se pomoću nje prati temperatura termičkog ulja u spremniku za zagrijavanje i temperatura unutar reaktora. Visokotlačni reaktor ima dvostruku stijenku (plašt) kojim protječe vruće ulje, barometar kojim se prati tlak pare, sigurnosnog ventila koji ne dozvoljava prekoračenje tlaka u reaktoru iznad 20 bara te temperaturna osjetila koja mjere temperaturu u reaktoru. Sirovina koja se predobrađuje smještena je unutar perforirane posude u reaktoru, dok se dodana tekućina izdvaja pomoću ventila smještenog na dnu reaktora.



**Slika 10.** Sustav za predobradu lignoceluloznih sirovina, A) kontrolna ploča, B) spremnik za ulje i C) visokotlačni reaktor

#### **Ostala oprema:**

- analitička vaga Shimadzu (Kyoto, Japan);
- mlinac za kavu Iskra MGM;
- mikser EV-100, Tehnica (Železniki, Slovenija);
- pH metar 744, Metrohm (Herisau, Švicarska);
- sušionik Instrumentarija ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- tehnička vaga Tehnica (Železniki, Slovenija);
- osobno računalo s programskim paketom Windows XP Professional;

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

- Oprema za filtraciju otopina [najlonski filtar (0,22  $\mu\text{m}$ , 47 mm; Magna, GE Water & Process Technologies, Michigan, SAD) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, SAD)];
- UV/Vis spektrofotometar Cary 13E Varian (Mulgrave, Australija);
- kvarcne kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka);
- centrifuga Harrier 18/10 (Sanyo, Watford, Velika Britanija);
- hladnjak i zamrzivač.

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprema sirovine

Lignocelulozna sirovina je mehanički usitnjena mlinom čekičarom kako bi se povećala kontaktna površina za predobradu i povećala učinkovitost hidrolize.

### 3.2.2 Određivanje sastava početne sirovine dvostrukom kiselinom hidrolizom

Izvagano je 0,4 g suhe slame, samljevene u mlinu, na Shimadzu analitičkoj vagi te je dodano u okruglu tikvicu s ravnim dnom zajedno s 4  $\text{cm}^3$  72 %-tne  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Sadržaj tikvice promiješan je protresanjem tikvice kako bi sva sirovina bila u kontaktu s kiselinom. Nakon inkubacije tikvice na 30 °C jedan sat, dodano je 112  $\text{cm}^3$  demineralizirane vode te se sirovina kuhala 4 sata uz povratno hladilo. Sadržaj tikvice povremeno je promiješan protresanjem tikvice kako bi se minimalizirali gubitci uslijed hvatanja sirovine na stjenke tikvice. Nakon kuhanja, sirovina je ohlađena pod mlazom vode i profiltrirana vakuum filtracijom kroz celulozni filtar papir preko büchnerovog lijevka. Filtrat je izdvojen za određivanje koncentracije topivog lignina i ukupnih furana (HMF i furfural) te šećera HPLC-om, dok je retentat ispran naljevima vruće vode do pH 6 i prebačen u petrijevu zdjelicu za sušenje i određivanje netopivog lignina.

### 3.2.3 Predobrada lignocelulozne sirovine u visokotlačnom reaktoru

Izvagano je 500 g suhe tvari sirovine usitnjene mlinom čekičarom (tip NA 45), što uz postotak vlage od 7,2 % iznosi 538,4 g. Slama je prebačena u reaktor za predobradu te je dodano 10  $\text{dm}^3$  vodovodne vode zajedno s 57,5  $\text{cm}^3$  96 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  tako da je koncentracija sulfatne kiseline iznosila 1 %. Ulje za zagrijavanje reaktora bilo je zagrijavano u zasebnom

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

spremniku, povezanom cijevima za visokotlačni reaktor. Vruće ulje je protjecalo kroz vanjski plašt reaktora i zagrijavalo reaktor do temperature od 210 °C. Provedena su četiri eksperimenta s različitim vremenima zadržavanja i koncentracijom kiseline, dok su se procesni parametri mjerili pomoću ugrađenih temperaturnih osjetila i tlakomjera. S dosegom radne temperature od 210 °C i tlakom od 20 bara mjerilo se vrijeme zadržavanja na toj temperaturi od 10, 5 i 1 minute i ponovo 5 minuta s koncentracijom kiseline od 0,5 % (28,75 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Nakon isteka vremena, tlak je spušten na atmosferski ventilom, a tekuća faza je ispuštena kroz ventil na dnu te joj je izmjeren volumen. Čvrsta faza hidrolizata bila je izdvojena pomoću perforirane posude s ručkom i izvagana. Uzorci su pohranjeni na -20 °C.

#### 3.2.4 Određivanje ukupne suhe tvari u predobrađenoj sirovini

Uzorak od 50 g je prebačen u petrijevu zdjelicu kako bi se odredila ukupna suha tvar. Petrijeve zdjelice su prethodno bile osušene u sušioniku, prebačene u eksikator na hlađenje 10 minuta, nakon čega im je izmjerena masa. Uzorci u petrijevki su stavljeni na sušenje pri temperaturi od 105 °C. Nakon 24 sata sušenja, uzorci su ohlađeni te im je ponovo izmjerena masa. Udjel suhe tvari izračunat je prema formuli:

$$w(s. tv.) = \frac{m(\text{petrijevke nakon sušenja}) - m(\text{prazne petrijevke})}{m(\text{izvaganog uzorka nakon predobrade})} \times 100$$

#### 3.2.5 Određivanje udjela netopivog lignina u čvrstoj fazi hidrolizata

Isprani čvrsti dio zaostao na filteru papiru nakon kiselinske hidrolize je prebačen u prethodno osušenu i izvaganu petrijevu zdjelicu i osušen na temperaturi od 105 °C kroz 24 sata. Nakon sušenja, uzorak je ponovo izvagan te je određen netopivi udjel lignina zaostao nakon kiselinske hidrolize.

#### 3.2.6 Određivanje topivog lignina u tekućoj fazi hidrolizata

Od permeata filtracije nakon kiselinske hidrolize je izdvojen alikvot za određivanje topivog lignina spektrofotometrijom. Uređaj korišten za analizu je spektrometar Cary 13E, Varian te je uzorku određena apsorbancija na 205 nm u tri ponavljanja. Zbog točnosti



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

mjerenja i određivanja koncentracija, uzorak je pripremljen uz zadovoljavajuće razrijeđenje s demineraliziranom vodom kako bi mu apsorbancija iznosila između 0,7 i 1.

#### 3.2.7 Priprema standardne otopine i baždarnog dijagrama furana

Pripravi se 50 cm<sup>3</sup> matične otopine furfurala miješanjem 2,18 mm<sup>3</sup> 99 % otopine furfurala sa 50 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode u odmjernoj tikvici tako da je masena koncentracija  $\gamma = 50 \text{ mg dm}^{-3}$  ( $M_{r,\text{furfural}} = 96,09 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\rho_{\text{furfural}} = 1,16 \text{ g dm}^{-3}$ ). Sadržaj tikvice promiješa se izokretanjem tikvice nekoliko puta. Ovako pripremljena matična otopina koristi se za pripremu otopina furfurala koncentracija 0,00; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 5,00; 7,00 i 10,00 mg dm<sup>-3</sup>. Pripravljenim se otopinama izmjeri apsorbancija pri 284 i 320 nm te se nacrtaju baždarni dijagrami ovisnosti razlike apsorbancije ( $\Delta A$ ) o koncentraciji furfurala ( $\gamma_{\text{furfural}}$ ; Martinez i sur., 2000.). Prilikom određivanja jednadžbe baždarnog pravca u obzir se uzima samo linearan dio pravca.

#### 3.2.8 Određivanje inhibitora fermentacije - ukupnih furana i kiselina

Izdvojeni je alikvot (6 mm<sup>3</sup>) tekućeg dijela nakon hidrolize kiselinom razrijeđen tisuću puta demineraliziranom vodom (6 cm<sup>3</sup>) i određena mu je apsorbancija spektrofotometrom na 284 nm i 320 nm u tri ponavljanja. Razlika ovih dvaju vrijednosti je uzeta za računanje ukupnih furana iz baždarnog dijagrama. Udjeli kiselina (mravlje, octene i levulinske) u hidrolizatu određeni su na način opisan u 3.2.10.

#### 3.2.9 Izrada baždarnih dijagrama za određivanje fermentabilnih šećera u hidrolizatu lignocelulozne sirovine

Pripremljene su standardne otopine glukoze u koncentraciji od 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 4 i 10 g dm<sup>-3</sup>. Otopine su potom analizirane na HPLC-u u tri ponavljanja. Površina ispod krivulje na kromatogramu zabilježena je za svako ponavljanje te je izračunata srednja vrijednost sva tri ponavljanja. Postupak je ponovljen za sve koncentracije otopina glukoze. Baždarni dijagram izrađen je kao ovisnost površine ispod krivulje kromatograma u ovisnosti o masenoj koncentraciji ( $\gamma$ ; g dm<sup>-3</sup>). Prilikom određivanja jednadžbe baždarnog pravca u obzir se uzima samo linearan dio pravca. Baždarni dijagrami za ksilozu i arabinozu određeni su istom procedurom.

#### **3.2.10 Priprema uzoraka i određivanje koncentracije fermentabilnih šećera**

Uzorku ( $500 \text{ mm}^3$ ) je dodana otopina cinkovog sulfata heptahidrata  $\gamma = 500 \text{ g dm}^{-3}$  u volumenu od  $500 \text{ mm}^3$ . Ovako pripremljena otopina izmiješa se u mikropruveti ( $1,5 \text{ cm}^3$ ) i ostavi da stoji 20 minuta (Grant i sur., 2002.). Istaloženi proteini izdvojeni su centrifugiranjem u Harrier 18/10 centrifugi na 10 000 o/min kroz 5 minuta. Supernatant preostao nakon centrifugiranja se pažljivo izdvaja pomoću pipetmana, prebacuje u špricu te se profiltrira kroz najlonski mikrofiltrar veličine pora  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$  u vijalu. Uzorak se razdvaja na komponente pomoću opisanog HPLC uređaja. Dobiveni kromatogram je analiziran računalnim sustavom CLASS-VP v.6.10 za identifikaciju spojeva, dok se površina ispod krivulje koristila za kvantitativnu analizu pomoću prethodno pripremljenog baždarnog dijagrama (potpoglavlje 3.2.9).

## **REZULTATI**

### 4.1 Određivanje sastava pšenične slame

Određivanje sastava lignocelulozne sirovine bilo je provedeno dvostrukom hidrolizom 0,4 g uzorka slame sa 72 %-tnom sulfatnom kiselinom, nakon čega se filtrat podvrgnuo HPLC analizi, kako je opisano u potpoglavljima 3.2.2 i 3.2.10. Dobivene koncentracije šećera i nusprodukata razgradnje šećera (octena, mravlja i levulinska kiselina te furfural i hidrosimetil furfural) određene iz baždarnih pravaca nakon HPLC analize koristile su se u daljnjem izračunu mase i udjela prisutnih spojeva (opisano u potpoglavljima 3.2.9 i 3.2.10). Udjel lignina određen je odvagom čvrste faze zaostale nakon hidrolize (opisano u potpoglavljju 3.2.5)

Ukupni volumen tekuće faze dobivene filtracijom nakon hidrolize uzorka slame iznosio je 111 cm<sup>3</sup>, dok je masa zaostale čvrste faze nakon sušenja iznosila 0,06599 g. Sastav lignocelulozne sirovine prikazan kao udjel pojedine komponente u slami (grama suhe tvari po gramu slame; [w/w]) dan je u Tablici 3.

**Tablica 3.** Masa i udjel komponenti u pšeničnoj slami za predobradu, određenih pomoću HPLC-a

Komponenta	Ukupna određena masa [g]	Udjel (%) [w/w]
Glukan	0,17480	43,70
Ksilan	0,08733	21,83
Arabinan	0,01348	3,37
Octena kiselina	0,00658	1,65
Lignin topiv u kiselini	0,00010	0,27
Lignin netopiv u kiselini	0,04192	10,48
Proteini	0,01600	4,00
Pepeo	0,02400	6,00
Furani	0,00338	0,85

## **4.2 Određivanje sastava hidrolizata pšenične slame dobivenog predobradom u visokotlačnom reaktoru kod različitih procesnih parametara**

Fizikalno-kemijska predobrada pšenične slame bila je rađena u visokotlačnom reaktoru s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  kao katalizatorom kod 210 °C i 20 bara. Temperatura i tlak procesa bili su konstantni, a eksperimenti su se provodili pri vremenima zadržavanja od 10, 5 i 1 minute pri 1 %-tnoj i 5 minuta pri 0,5 %-tnoj koncentraciji sulfatne kiseline.

Rezultati istraživanja utjecaja različitih vremena zadržavanja i koncentracije  $\text{H}_2\text{SO}_4$  na sastav dobivenog hidrolizata prikazani su u potpoglavljima 3.2.1 – 3.2.4 te u Tablici 4. – 12. i na Slici 11. - 14. Udjeli pojedinih komponenti prikazani su kao postotak od 500 g suhe tvari neobrađene slame.

### **4.2.1 Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 10 minuta uz 1 %-tnu $\text{H}_2\text{SO}_4$ kao katalizator**

Rezultati prikazani u Tablici 4. – 5. i Slici 11. – 14. dobiveni su predobradom 500 g suhe tvari (s.tv.) slame pri 210 °C, 20 bara i vremenu zadržavanja od 10 minuta uz 1 %-tnu sulfatnu kiselinu kao katalizator procesa predobrade.

Ukupni preostali volumen tekuće faze nakon predobrade u prethodno navedenim uvjetima iznosio je 5,34 dm<sup>3</sup>, a ukupna vlažna masa predobrađene sirovine bila 1474,5 g.

#### 4. REZULTATI

**Tablica 4.** Masa i udjel komponenti u tekućoj fazi hidrolizata pšenične slame dobivenog kod vremena zadržavanja od 10 minuta uz 1 %-tnu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Komponente u tekućoj fazi hidrolizata		
<b>Monosaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukoza	3,54	0,71
Ksilozna	14,11	2,82
Arabinoza	4,38	0,88
Ukupna masa u sirovini [g]	22,03	
<b>Polisaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukan	3,19	0,64
Ksilan	12,42	2,48
Arabinan	3,94	0,79
Ukupna masa u sirovini [g]	19,55	
<b>Kiseline</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Mravlja kiselina	20,82	4,16
Octena kiselina	6,09	1,22
Levulinska kiselina	26,49	5,30
Ukupna masa u sirovini [g]	53,40	
<b>Ukupni furani</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Furfural i hidroksimetil furfural	6,34	1,27
<b>Lignin</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Lignin topiv u kiselini (LTK)	5,00	1

#### 4. REZULTATI

**Tablica 5.** Masa i udjel komponenti u čvrstoj fazi hidrolizata pšenične slame dobivenog kod vremena zadržavanja od 10 minuta uz 1 %-tnu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Komponente u čvrstoj fazi hidrolizata		
<b>Monosaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukoza	14,52	2,90
Ksiloz	3,91	0,78
Arabinoza	1,92	0,38
Ukupna masa u sirovini [g]	20,35	
<b>Polisaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukan	12,78	2,56
Ksilan	3,52	0,70
Arabinan	1,73	0,35
Ukupna masa u sirovini [g]	18,03	
<b>Kiseline</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Mravlja kiselina	9,16	1,83
Octena kiselina	0,00	0,00
Levulinska kiselina	0,00	0,00
Ukupna masa u sirovini [g]	9,16	
<b>Ukupni furani</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Furfural i hidroksimetil furfural	0,00	0,00
<b>Lignin</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Lignin netopiv u kiselini + pepeo (LNTK)	183,69	36,74

#### 4.2.2 Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 5 minuta 1 %-tnu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao katalizator

Rezultati prikazani u Tablici 6. – 7. i Slici 11. – 14. dobiveni su predobradom 500 g suhe tvari (s.tv.) slame pri 210 °C, 20 bara i vremenu zadržavanja od 5 minuta uz 1 %-tnu sulfatnu kiselinu kao katalizator procesa predobrade.

Ukupni preostali volumen tekuće faze nakon predobrade pri ovim uvjetima je iznosio 5,42 dm<sup>3</sup>, dok je ukupna vlažna masa predobrađene sirovine bila 1293,7 g.

#### 4. REZULTATI

**Tablica 6.** Masa i udjel komponenti u tekućoj fazi hidrolizata pšenične slame dobivenog kod vremena zadržavanja od 5 minuta uz 1 %-tnu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Komponente u tekućoj fazi hidrolizata		
<b>Monosaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukoza	33,47	6,69
Ksiloza	13,61	2,71
Arabinoza	4,68	0,94
Ukupna masa u sirovini [g]	51,76	
<b>Polisaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukan	30,12	6,02
Ksilan	11,98	2,40
Arabinan	4,22	0,84
Ukupna masa u sirovini [g]	46,32	
<b>Kiseline</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Mravlja kiselina	18,40	3,68
Octena kiselina	6,83	1,28
Levulinska kiselina	14,60	2,92
Ukupna masa u sirovini [g]	39,38	
<b>Ukupni furani</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Furfural i hidroksimetil furfural	9,63	1,93
<b>Lignin</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Lignin topiv u kiselini (LTK)	4,80	0,96



#### 4. REZULTATI

**Tablica 7.** Masa i udjel komponenti u čvrstoj fazi hidrolizata pšenične slame dobivenog kod vremena zadržavanja od 5 minuta uz 1 %-tnu  $H_2SO_4$

Komponente u čvrstoj fazi hidrolizata		
<b>Monosaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukoza	21,15	4,23
Ksiloz	3,66	0,73
Arabinoza	0,00	0,00
Ukupna masa u sirovini [g]	24.81	
<b>Polisaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukan	18,61	3,72
Ksilan	3,29	0,66
Arabinan	0,00	0,00
Ukupna masa u sirovini [g]	21.9	
<b>Kiseline</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Mravlja kiselina	0,00	0,00
Octena kiselina	0,00	0,00
Levulinska kiselina	0,00	0,00
Ukupna masa u sirovini [g]	0.00	
<b>Ukupni furani</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Furfural i hidroksimetil furfural	0,00	0,00
<b>Lignin</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Lignin netopiv u kiselini + pepeo (LNTK)	164,22	32,84

#### 4.2.3 Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 1 minute uz 1 %-tnu $H_2SO_4$ kao katalizator

Rezultati prikazani u Tablici 8. – 9. i Slici 11. – 14. dobiveni su predobradom 500 g suhe tvari (s.tv.) slame pri 210 °C, 20 bara i vremenu zadržavanja od 1 minute uz 1 %-tnu sulfatnu kiselinu kao katalizator procesa predobrade.

Ukupni preostali volumen tekuće faze nakon predobrade pri ovim uvjetima je iznosio 5,64 dm<sup>3</sup>, dok je ukupna vlažna masa predobrađene sirovine bila 1361,7 g.

#### 4. REZULTATI

**Tablica 8.** Masa i udjel komponenti u tekućoj fazi hidrolizata pšenične slame dobivenog kod vremena zadržavanja od 1 minute uz 1 %-tnu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Komponente u tekućoj fazi hidrolizata		
<b>Monosaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukoza	18,24	3,65
Ksilozo	16,10	3,22
Arabinoza	3,24	0,65
Ukupna masa u sirovini [g]	37,58	
<b>Polisaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukan	16,41	3,28
Ksilan	14,17	2,83
Arabinan	2,92	0,58
Ukupna masa u sirovini [g]	33,5	
<b>Kiseline</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Mravlja kiselina	10,95	2,19
Octena kiselina	4,39	0,88
Levulinska kiselina	19,40	3,88
Ukupna masa u sirovini [g]	34,74	
<b>Ukupni furani</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Furfural i hidroksimetil furfural	12,51	2,50
<b>Lignin</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Lignin topiv u kiselini (LTK)	4,50	0,9

#### 4. REZULTATI

**Tablica 9.** Masa i udjel komponenti u čvrstoj fazi hidrolizata pšenične slame dobivenog kod vremena zadržavanja od 1 minute uz 1 %-tnu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Komponente u čvrstoj fazi hidrolizata		
Monosaharid	Masa [g]	Udjel (%) [w/w]
Glukoza	10,17	2,03
Ksilozna	3,76	0,75
Arabinoza	0,72	0,14
Ukupna masa u sirovini [g]	14,65	
Polisaharid	Masa [g]	Udjel (%) [w/w]
Glukan	8,95	1,79
Ksilan	3,38	0,68
Arabinan	0,65	0,13
Ukupna masa u sirovini [g]	12,98	
Kiseline	Masa [g]	Udjel (%) [w/w]
Mravlja kiselina	7,61	1,52
Octena kiselina	0,00	0,00
Levulinska kiselina	0,00	0,00
Ukupna masa u sirovini [g]	7,61	
Ukupni furani	Masa [g]	Udjel (%) [w/w]
Furfural i hidroksimetil furfural	0,00	0,00
Lignin	Masa [g]	Udjel (%) [w/w]
Lignin netopiv u kiselini + pepeo (LNTK)	157,88	31,58

#### 4.2.4 Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 5 minuta uz 0,5 %-tnu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao katalizator

Rezultati prikazani u Tablici 10. – 11. i Slici 11. – 14. dobiveni su predobradom 500 g suhe tvari (s.tv.) slame pri 210 °C, 20 bara i vremenu zadržavanja od 5 minuta uz 0,5 %-tnu sulfatnu kiselinu kao katalizator procesa predobrade.

Ukupni preostali volumen tekuće faze nakon predobrade pri ovim uvjetima je iznosio 4,8 dm<sup>3</sup>, dok je ukupna vlažna masa predobrađene sirovine bila 1882,3 g.

#### 4. REZULTATI

**Tablica 10.** Masa i udjel komponenti u tekućoj fazi hidrolizata pšenične slame dobivenog kod vremena zadržavanja od 5 minuta uz 0,5 %-tnu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Komponente u tekućoj fazi hidrolizata		
<b>Monosaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukoza	40,77	8,15
Ksilozo	30,73	6,15
Arabinoza	6,36	1,27
Ukupna masa u sirovini [g]	77,86	
<b>Polisaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukan	36,69	7,34
Ksilan	27,04	5,41
Arabinan	5,72	1,14
Ukupna masa u sirovini [g]	69,45	
<b>Kiseline</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Mravlja kiselina	5,66	1,13
Octena kiselina	3,74	0,75
Levulinska kiselina	1,26	0,25
Ukupna masa u sirovini [g]	10,66	
<b>Ukupni furani</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Furfural i hidroksimetil furfural	8,26	1,65
<b>Lignin</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Lignin topiv u kiselini (LTK)	4,20	0,84

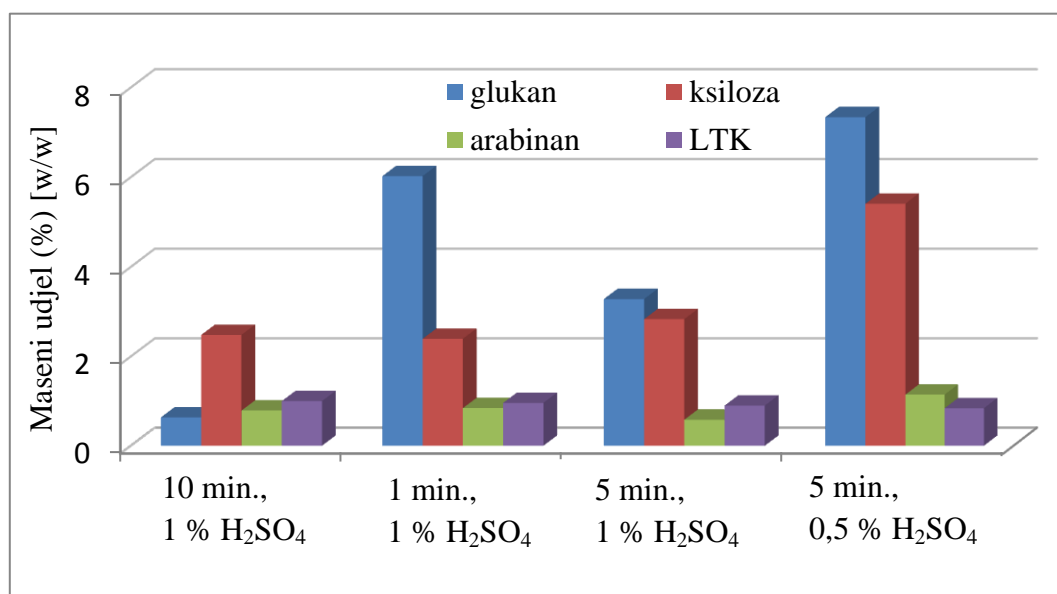
#### 4. REZULTATI

**Tablica 11.** Masa i udjel komponenti u čvrstoj fazi hidrolizata pšenične slame dobivenog kod vremena zadržavanja od 5 minuta uz 0,5 %-tnu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

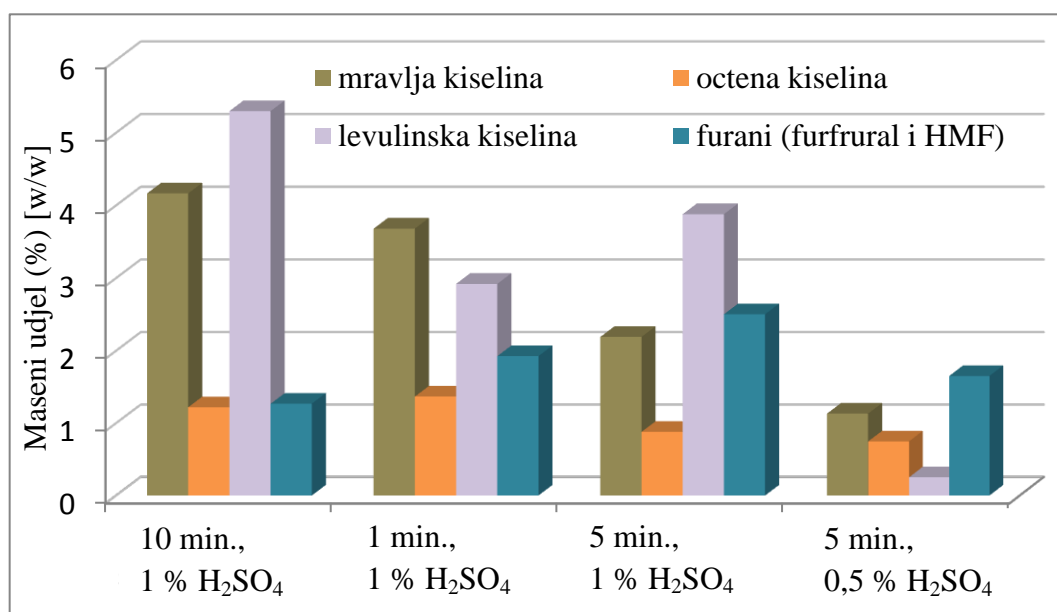
Komponente u čvrstoj fazi hidrolizata		
<b>Monosaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukoza	206,15	41,23
Ksiloz	0,00	0,00
Arabinoza	0,00	0,00
Ukupna masa u sirovini [g]	210,14	
<b>Polisaharid</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Glukan	185,20	37,04
Ksilan	0,00	0,00
Arabinan	0,00	0,00
Ukupna masa u sirovini [g]	185,20	
<b>Kiseline</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Mravlja kiselina	0,00	0,00
Octena kiselina	0,00	0,00
Levulinska kiselina	0,00	0,00
Ukupna masa u sirovini [g]	0,00	
<b>Ukupni furani</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Furfural i hidroksimetil furfural	0,00	0,00
<b>Lignin</b>	<b>Masa [g]</b>	<b>Udjel (%) [w/w]</b>
Lignin netopiv u kiselini + pepeo (LNTK)	159,79	31,96

### 4.3 Usporedba utjecaja vremena zadržavanja i koncentracije H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na sastav hidrolizata pšenične slame

U ovom poglavlju prikazani su rezultati usporedbe procesa predobrade pšenične slame kod različitih vremena zadržavanja i koncentracije H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Određena je i efikasnost procesa predobrade (Tablica 12.).

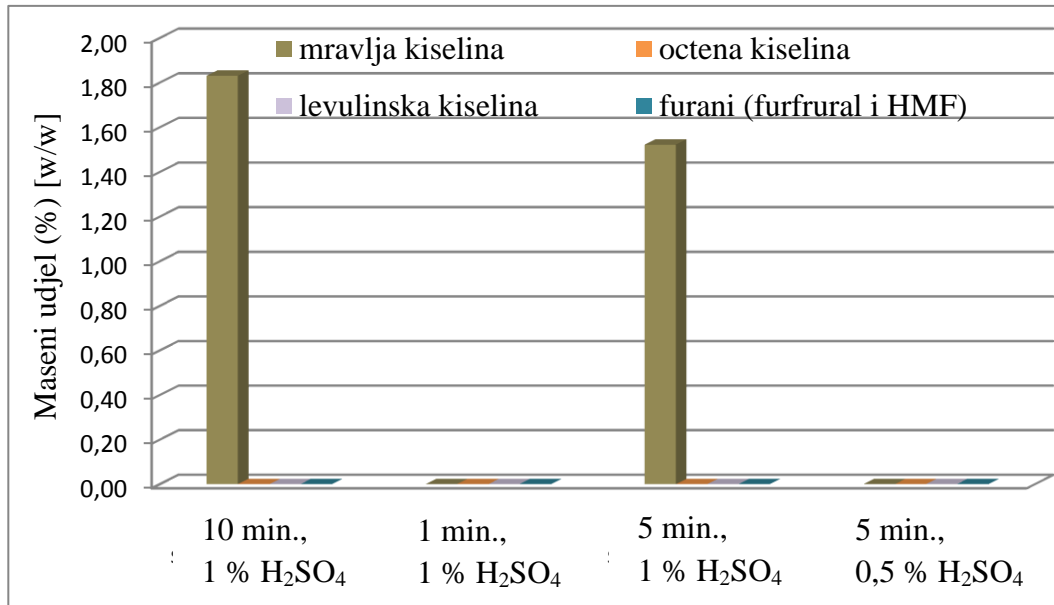


**Slika 11.** Udjeli pojedinih šećera u tekućoj fazi hidrolizata pšenične slame dobivenih kod različitih uvjeta njene predobrade

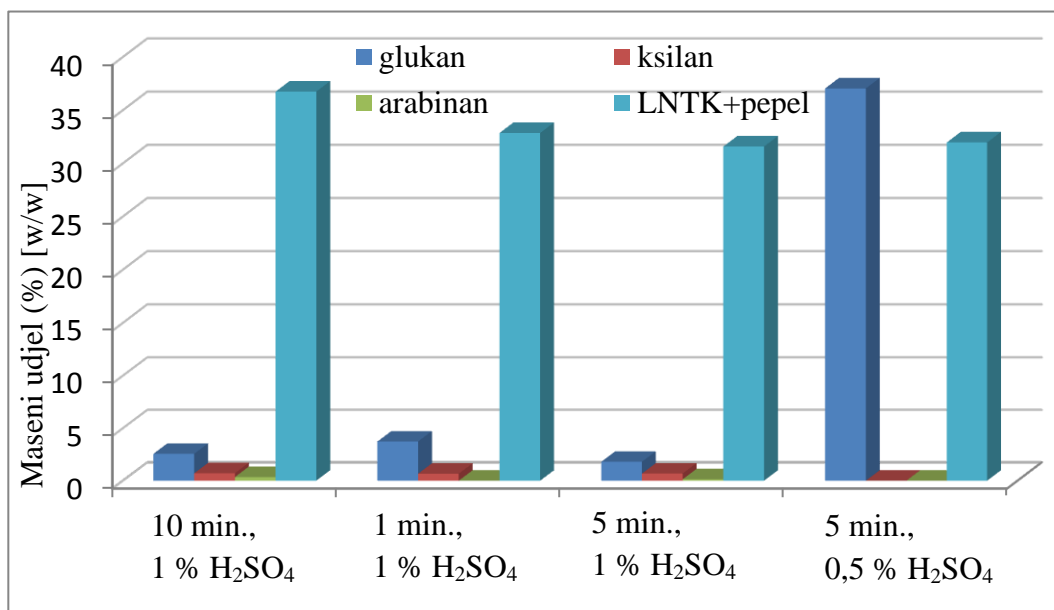


**Slika 12.** Udjeli inhibitora fermentacije u tekućoj fazi hidrolizata pšenične slame dobivenih kod različitih uvjeta njene predobrade

#### 4. REZULTATI



**Slika 13.** Udjeli pojedinih šećera u čvrstoj fazi hidrolizata pšenične slame dobivenih kod različitih uvjeta njene predobrade



**Slika 14.** Udjeli inhibitora fermentacije u čvrstoj fazi hidrolizata pšenične slame dobivenih kod različitih uvjeta njene predobrade

#### 4. REZULTATI

**Tablica 12.** Usporedba efikasnosti procesa predobrade pšenične slame kod različitih uvjeta

Tvar	Efikasnost (%)			
	10 min., 1 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 min., 1 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 min., 1 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 min., 0,5 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Glukan	1,46	13,78	7,51	16,80
Ksilan	11,36	10,99	12,96	24,78
Arabinan	23,44	24,93	17,21	33,83
Ukupni šećeri	5,68	13,44	9,71	20,16



## **RASPRAVA**

Određivanje sastava lignocelulozne sirovine bilo je provedeno dvostrukom kiselinskom hidrolizom pomoću  $H_2SO_4$ , a opisano je u potpoglavlju 3.2.2. Rezultati dobiveni HPLC analizom prikazani su u Tablici 3. u potpoglavlju 4.1. Određivanje sastava pšenične slame dobivene predobradom u visokotlačnom reaktoru kod različitih vremena zadržavanja i koncentracija  $H_2SO_4$  rađeno je pomoću HPLC-a i spektrofotometra. Koncentracija šećera određivana je u čvrstoj i tekućoj fazi metodom opisanom u potpoglavlju 3.2.10. Uz koncentraciju fermentabilnih šećera, određivani su i inhibitori fermentacije (octena, levulinska i mravlja kiselina te ukupni furani), kao i u kiselini topiv i netopiv lignin (potpoglavlja 3.2.5 – 3.2.10).

### 5.1 Određivanje sastava pšenične slame

Usporedbom dobivenih udjela polisaharida izračunatih iz kromatograma (Tablica 3.) sa literaturnim vrijednostima prema Boe i sur. (2007.) uzetima kao referentnima (Tablica 1.), vidljivo je kako su njihovi udjeli u pšeničnoj slami zapravo veći nego što je očekivano. Koncentracija glukana veća je za više od 10 % (43,7 %), dok su koncentracije određenog ksilana i arabinana približno jednake referentnim vrijednostima, no i dalje su veće. Lignin netopiv u kiselini jednakog je udjela (oko 10,5 %), a udjel lignina topivog u kiselini određenog spektrofotometrijski je za devet puta manji od literaturne vrijednosti (2,5 %). Takva devijacija moguća je posljedica različitosti ne samo vrste slame, već i klimatskih uvjeta u kojima je ona uzgojena. Alriksson i sur. (2013.) istraživali su utjecaj predobrade na nastajanje inhibitora te su uočili da octena kiselina inhibira proces fermentacije *Saccharomyces cerevisiae* tek pri koncentracijama većim od 100 mM. Iz tog proizlazi da određena koncentracija octene kiseline od 0,987 mM (0,0593 g dm<sup>-3</sup>) u početnoj sirovini, kao nusprodukta nastalih kiselinskom razgradnjom šećera, nije dovoljna za značajnu inhibiciju fermentacije monosaharida u etanol. Dok je maseni udjel lignina topivog u kiselini (0,27 %) manji od literaturne vrijednosti (2,5 %), udjel u kiselini netopivog lignina je otprilike jednak referentnoj vrijednosti (10,9 %) kada se u izračun uzme u obzir i udjel pepela od 6 %. Ovakav rezultat pretpostavlja da su ove vrijednosti lignina posljedica prethodno navedenih uvjeta.

## **5.2 Određivanje sastava hidrolizata pšenične slame dobivenog kod različitih uvjeta predobrade u visokotlačnom reaktoru**

### **5.2.1 Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 10 minuta uz 1 %-tnu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao katalizator**

Udjeli polisaharida u tekućoj fazi predobrađene slame pri vremenu zadržavanja od 10 minuta i 1 %-tnoj sulfatnoj kiselini, dobivenih HPLC analizom, značajno su manji od udjela u polaznoj sirovini. Udjel glukana u hidrolizatu slame (0,64 %) razlikuje se za više od 60 puta, ksiloza (2,48 %) za 10 puta, no udjel arabinana manji je za tek 0,5 % u odnosu na početnu sirovinu. Nastali inhibitori fermentacije čine čak 10 % inicijalne mase, sa najvećim udjelom levulinske kiseline od 5,3 % i nešto manjim udjelom nastale mravlje kiseline (4,16 %). Masa nastale octene kiseline čini tek 1,22 % što je vrlo blizu 1,65 % octene kiseline određene u početnoj sirovini. 5 g lignina bilo je prevedeno u tekuću fazu predobrađom slame u ovim uvjetima, što odgovara udjelu od 1 % od ukupne početne mase suhe tvari te je za nešto manje od 5 puta veći od lignina topivog u kiselini, određenog analizom početne sirovine.

Određivanjem sastava čvrste faze hidrolizata pšenične slame utvrđeno je da 12,78 g glukana nije prevedeno u tekuću fazu. To čini 2,56 % od 500 g s.tv. početne sirovine, što je značajan udjel s obzirom da je čak četiri puta manja masa glukana zapravo dospjela u tekuću fazu. Udjel arabinana zaostalog u čvrstoj fazi dva puta je manji nego u tekućoj, dok je ksilan za tri i pol puta manji. Od inhibitora jedino je mravlja kiselina određena u čvrstoj fazi u masi od 9,16 g, odnosno 1,83 %. Masa neobrađenog lignina (lignin netopiv u kiselini, LNTK), zajedno s pepelom iznosi 183,69 g i predstavlja udjel od 36,74 % [w/w]. Lignin netopiv u kiselini u početnoj sirovini manji je za čak 3 puta. Velik udjel lignina netopivog u kiselini zajedno s malim udjelom glukana prevedenog u tekuću fazu (i zaostalog u čvrstoj fazi) dovodi do zaključka kako uvjeti procesa nisu optimirani te je moguće kako se ovi značajni gubitci mase javljaju uslijed preekstremnih uvjeta procesa predobrade.

Alvira i sur. (2016.) istraživali su utjecaj procesa predobrade eksplozije vodenom parom odnosno enzima na sastav hidrolizata pšenične slame. Temperature zadržavanja varirale su od 170 °C - 210 °C, a vremena zadržavanja od 5 – 30 minuta te su radili sa 150 g slame i 1,5 dm<sup>3</sup> vode. Sastav pšenične slame bio je sličan je u oba slučaja. U predobradi enzimima, udjeli šećera u tekućoj fazi veći su za 15 puta od procesa koji nije kataliziran enzimima. Međutim, pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 10 minuta te bez

dodanih enzima, udjel glukoze je četiri puta veći nego u ovom radu, provedenome na 210 °C i istome vremenu zadržavanja. Udjel arabinoze otprilike je podjednak kao kod Alvira i sur. (2016. ; 0,75 %), a udjel ksiloze je bio veći za tri puta. Udjeli nastalih inhibitornih spojeva također su manji kod Alvira i sur. (2016.), dok je udjel furana manji za dva puta (0,46 %), a mravlje kiseline za deset puta (0,41 %) u odnosu na ovo istraživanje.

U cilju povećanja prinosa fermentabilnih šećera i smanjenja njihove razgradnje u octenu, levulinsku i mravlju kiselinu te furane, daljnji eksperimenti provedeni su s kraćim vremenom zadržavanja.

### **5.2.2 Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 5 minuta uz 1 %-tnu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao katalizator**

Iz rezultata dobivenih analizom tekuće faze hidrolizata pšenične slame pri 5 minuta zadržavanja i 1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao katalizatora (Tablica 6.) vidljivo je povećanje udjela glukana i arabinana te smanjenje udjela inhibitora fermentacije u odnosu na eksperiment proveden kod vremena zadržavanja od 10 minuta (Tablica 4.). Udjel glukana čini 6,02 % ukupne mase suhe tvari neobrađene slame, dok udjel arabinana iznosi 0,84 % što je četiri puta manje od udjela u početnoj sirovini (3,37 %). Maseni postotak određenog ksilana iznosi tek 2,4 % te je oko deset puta manji od udjela određenog u početnoj sirovini. Značajnije smanjenje količine inhibitora reakcije uočljivo je kod levulinske kiseline, čiji udjel iznosi 2,92 % što je za više od dva puta manje u odnosu na prethodni eksperiment (tablica 4.). Zbog nižih udjela mravlje, octene i levulinske kiseline, udjel ukupnih furana (furfural i hidroksimetil furfural) određenih u tekućoj fazi povećao se na 1,93 %. Udjel lignina topivog u kiselini iznosi tek nešto manje u odnosu na predobradu provedenu kod vremena zadržavanja od 10 minuta (0,96 %).

Maseni udjel glukana u čvrstoj fazi hidrolizata pšenične slame porastao je za 1,16 % i iznosi 3,72 %. Udjel ksilana otprilike je podjednak (0,66 %) dok arabinan nije određen u čvrstoj fazi hidrolizata. Također, provedenom analizom, primijećeno je da čvrsta faza ne sadrži inhibitore fermentacije (mravlja, octena i levulinska kiselina te furani). Udjel lignina netopivog u kiselini smanjio se za 20 grama i iznosi 32,84 % mase početne sirovine.

Udjel glukoze veći je nego u eksperimentima koje su provodili Alvira i sur. (2016.) pri 5 minuta zadržavanja i temperaturi od 210 °C (1,6 %), a određena ksiloza i arabinoza su manje. Ukupni furani kod Alvira i sur. (2016.) iznose 0,31 % što je za šest puta manje nego u

## 5. RASPRAVA

ovom istraživanju, dok udjeli mravlje i octene kiseline iznose 0,24 % i 0,78 % u usporedbi s 3,68 % i 1,28 % određenim u hidrolizatu pšenične slame predobrađene pri istim uvjetima procesa u ovom istraživanju. Međutim, Alvira i sur. (2016.) nisu radili proces predobrade s 1 %-tnom  $H_2SO_4$ .

### 5.2.3 Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru kod vremena zadržavanja od 1 minute uz 1 %-tnu $H_2SO_4$ kao katalizator

Provedbom procesa predobrade u visokotlačnom reaktoru pri 210 °C, 20 bara i vremenom zadržavanja od 1 minute, pri istoj koncentraciji kiseline kao i prije, nastojala se postići razgradnja lignocelulozne sirovine s većom efikasnošću, odnosno tako da se više šećera prevede u tekuću fazu. Maseni udjeli glukana (3,28 %), ksilana (2,83 %) i arabinana (0,58 %) prikazani u Tablici 8., manji su u odnosu na proces predobrade kod vremena zadržavanja od 5 minuta (Tablica 6.). Najveći udjel nastalog inhibitora pripada levulinskoj kiselini (3,88 %), dok su udjeli ostalih inhibitora 2,19 % mravlje kiseline odnosno 0,88 % octene kiseline. Udjel furana od 2,5 % indicira na prekratko vrijeme zadržavanja za daljnju razgradnju furana u octenu, mravlju ili levulinsku kiselinu, no i na gubitak polisaharida raspadom do furana. Smanjenje ukupne mase tih inhibitora za oko 4,5 g naznaka je djelomične uspješnosti predobrade slame pri spomenutim uvjetima, no gubitkom 13 g polisaharida u odnosu na prijašnji eksperiment utvrđeno je kako su predobradom uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta s 1 %  $H_2SO_4$  ipak dobiveni najveći prinosi fermentabilnih šećera (Tablica 6.). Ovo je vrijeme stoga korišteno u daljnjem procesu uz optimizacije uvjeta predobrade.

Udjeli polisaharida zaostalih u čvrstoj fazi hidrolizata pšenične slame najmanji su u odnosu na prethodno provedene eksperimente te iznose 1,79 % za glukana, 0,68 % za ksilan i 0,13 % za arabinan s izuzetkom eksperimenta provedenog pri vremenu zadržavanja od 5 minuta (potpoglavlje 4.2.2), gdje je udjel arabinana u čvrstoj fazi hidrolizata iznosio 0 %. Maseni udjel određene mravlje kiseline iznosi 1,52 % , za 0,2 % manje u odnosu na eksperiment vođen pri 10 minuta zadržavanja. Octena i levulinska kiselina te furani nisu određeni u čvrstoj fazi hidrolizata pšenične slame. Određeni udjel lignina netopivog u kiselini iznosio je najmanje u odnosu na prethodno provedene eksperimente (31,96 %).

Istraživanje koje su proveli Galbe i sur. (2008.), 900 g pšenične slame tretirano je vodenom parom s 0,2 %-tnom  $H_2SO_4$  kao katalizatorom, pri temperaturi od 210 °C i vremenu

zadržavanja od 2 minute. Dobiveni udjel glukoze u tekućoj fazi hidrolizata iznosio je 1,25 %. Razlika od 2,4 % u odnosu na ovo istraživanje, moguća je posljedica korištenja manje koncentracije kiseline u njihovome slučaju. Udjel određenih furana manji je u odnosu na ovo istraživanje (za 2,1 %) kao i udjel octene kiseline (za 0,48 %), dok drugi inhibitori i šećeri nisu bili određeni tijekom istraživanja. Iako je vrijeme zadržavanja dulje, Galbe i sur. (2008.) uspjeli su dobiti relativno malen udjel inhibitora fermentacije, kao i malen udjel glukoze, što je posljedica korištenja kiseline male koncentracije.

### **5.2.4 Predobrada pšenične slame u visokotlačnom kod vremena zadržavanja od 5 minuta uz 0,5 %-tnu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao katalizator**

Iz Tablice 10., koja prikazuje rezultate analize tekuće faze hidrolizata pšenične slame pri vremenu zadržavanja od 5 minuta s 0,5 %-tnom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, vidljivo je kako su upravo u tim uvjetima postignuti najveći prinosi šećera. Maseni udjel glukana u tekućoj fazi iznosi 7,34 % [w/w] što je za 3,69 % više s obzirom na prethodni eksperiment (Tablica 8.), što je vidljivo i kod ksilana (6,15 %) i arabinana (1,27 %). Udjeli kiselina određenih u tekućoj fazi hidrolizata pri spomenutim uvjetima najmanji su u usporedbi s eksperimentima provedenim kod vremena zadržavanja od 10, 5 i 1 minute s 1 %-tnom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao katalizatorom. Udjel ukupnih furana od 1,65 %, zajedno s većom koncentracijom šećera naznačuje manju razgradnju šećera prilikom predobrade u ove produkte i samim time indikator je bolje efikasnosti procesa predobrade. Masa lignina topivog u kiselini iznosi 4,20 g, što odgovara vrijednosti masenog udjela od 0,84 %, a što je najmanja određena vrijednost u ovom istraživanju.

Iako su udjeli šećera u tekućoj fazi hidrolizata najveći u odnosu na prethodne pokuse, udjel glukana u čvrstoj fazi od 37,04 % ukazuje na par mogućnosti. Vrijeme zadržavanja od 5 minuta nije bilo dovoljno dugo da se većina glukana prevede u tekuću fazu, što pokazuje da je potrebno provesti proces optimizacije vremena zadržavanja kod 0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Drugi šećeri i inhibitori nisu detektirani u ovom eksperimentu. Udjel lignina netopivog u kiselini otprilike je zadržan istim u odnosu na eksperiment pri vremenu zadržavanja od 1 minute i koncentraciji 0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> te iznosi 31,96 %.

Usporedbom rezultata s Galbe i sur. (2008.), očito je kako korištena koncentracija kiseline kao katalizatora ima velik utjecaj na sastav hidrolizata pšenične slame nakon predobrade. U ovome se slučaju udjel glukoze prevedene u tekuću fazu razlikuje za 6,9 % te je također manji i udjel glukoze zaostale u čvrstoj fazi kod Galbe i sur. i iznosi 3,2 % za

eksperiment vođen pri 2 minute zadržavanja i 210 °C. Udjel octene kiseline u tekućoj fazi je nešto veći u ovom istraživanju (za 0,36 % u odnosu na Galbe i sur., 2008.), a udjel ukupnih furana veći je za oko četiri puta.

### **5.3 Usporedba utjecaja vremena zadržavanja i koncentracije H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na sastav hidrolizata pšenične slame**

Kako su temperatura predobrade (210 °C) i tlak (20 bara) bili konstantni za sve eksperimente, razlika koncentracija šećera (polisaharida) u tekućoj fazi hidrolizata, prikazanim u Tablici 4., 6., 8. i 10., rezultat je isključivo razlike vremena zadržavanja i koncentracije sulfatne kiseline upotrijebljene kao katalizatora. Udjel ksilana podjednak je u eksperimentima provedenim s 1 %-tnom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,5 %), što je i slučaj s arabinanom čiji je udjel nešto manji (0,58 %) u eksperimentu provedenom kod vremena zadržavanja od 1 minute. Udjel glukana u tekućoj fazi hidrolizata znatno se razlikuje u prva tri eksperimenta (Slika 11.). Pri vremenu zadržavanja od 10 minuta udjel glukana je najmanji te iznosi 0,64 %. Najviši udjel glukana određen je u eksperimentu vođenom pri vremenu zadržavanja od 5 minuta na 210 °C i iznosi 6,02 % dok je njegov maseni udjel pri 1 minuti zadržavanja otprilike 3 %. Kako se sumarno dobio najveći udjel fermentabilnih šećera u eksperimentu provedenom s 1 %-tnom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 5 minuta zadržavanja, za daljnje istraživanje odabrano je to vrijeme zadržavanja u cilju povišenja koncentracije šećera odnosno smanjenje koncentracije inhibitora fermentacije. U eksperimentu s vremenom zadržavanja od 5 minuta i 0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dobiven je najveći udjel fermentabilnih šećera (izraženih kao polisaharida) s udjelima od 7,34 % glukana, 5,41 % ksilana i 1,14 % arabinana. Maseni udjel topivog lignina određenog u tekućoj fazi hidrolizata bio je najveći kod 5 minuta zadržavanja s 0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6,11 %) odnosno najmanji (4,77 %) kod 5 minuta zadržavanja i 1 % sulfatne kiseline. Manji udjel lignina u tekućoj fazi hidrolizata pogoduje aktivnostima radnih mikroorganizama, zbog njegove niske biorazgradivosti.

Najveći maseni udjel inhibitora fermentacije (u tekućoj fazi) određen je u eksperimentu s 1 %-tnom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i vremenu zadržavanja od 10 minuta. Uz činjenicu da su šećeri određeni u tekućoj fazi ukupno najmanji, vrijeme zadržavanja predugo je za ovu koncentraciju kiseline te se većina šećera prevela u furane iz kojih su nastale octena, mravlja i levulinska kiselina. Udjel mravlje kiseline progresivno se smanjivao skraćivanjem vremena zadržavanja u istraživanju. Sličan trend zabilježen je kod octene kiseline, čiji se udjel tijekom

## 5. RASPRAVA

istraživanja smanjio za 0,53 % (Slika 12.). Maseni udjeli inhibitora najmanji su u eksperimentu s 0,5 %  $H_2SO_4$  i 5 minuta zadržavanja, što je popraćeno najvećim postotkom ukupnih fermentabilnih šećera (13,89 %).

Udjeli šećera u čvrstoj fazi hidrolizata nešto su veći od tekuće faze za glukan, s najvećim udjelom od 37,04 % u eksperimentu vođenom s 0,5 %-tnom  $H_2SO_4$ . Međutim, dobiveni rezultat posljedica je analitičke greške, ali i heterogenosti uzorka. Udjel glukana određen u eksperimentu s 1 %-tnom  $H_2SO_4$  pri 5 minuta zadržavanja iznosio je samo 3,72 %. Najveći udjel glukana određen pri toj koncentraciji kiseline u tekućoj fazi je pri 5 minuta zadržavanja i veći je za 2,3 % u odnosu na čvrstu fazu. Udjeli ksilana podjednaki su u eksperimentima s 1 %-tnom  $H_2SO_4$ , dok on nije detektiran u eksperimentu s 0,5 %-tnom kiselinom. Udjel arabinana u čvrstoj fazi hidrolizata najmanji je u eksperimentu s vremenom zadržavanja od 5 minuta i 1 %-tnom  $H_2SO_4$  te pri istom vremenu s 0,5 %-tnom kiselinom. Lignin netopiv u kiselini zajedno s pepelom (LNTK) smanjio se za 5,15 % skraćivanjem vremena zadržavanja te je u zadnjem eksperimentu (0,5 %  $H_2SO_4$ ) porastao za oko 0,3 %.

Inhibitori u čvrstoj fazi hidrolizata su određeni za eksperimente s 1 %-tnom sulfatnom kiselinom i vremenom zadržavanja od 10 i 1 minute. Oni uključuju samo mravlju kiselinu s malom varijacijom udjela koji iznose 1,83 % i 1,52 % za 10 i 1 minutu zadržavanja.

Gornja razmatranja najbolje su uočljiva kroz efikasnost oslobađanja određenih polisaharida iz sirovine u tekuću fazu (Tablica 12.). Iako je efikasnost dobivanja ksilana manja pri 5 minuta zadržavanja i 1 % sulfatne kiseline (10,98 %) te za arabinan pri 1 minuti zadržavanja na 210 °C (17,31 %), ukupno gledano ona je najmanja za eksperiment s vremenom zadržavanja od 10 minuta. Za eksperimente s 1 %-tnom  $H_2SO_4$  kao katalizatorom, ukupno su najveći udjeli i stoga i efikasnost procesa predobrade za 5 minuta zadržavanja. Od toga, izračunata efikasnost iznosi 13,79 % za glukan, što je za 6 % više u odnosu na drugu najveću izračunatu efikasnost za glukan (pri 1 minuti zadržavanja). U istome eksperimentu izračunata efikasnost dobivanja arabinana iznosi 25,02 %, što je za 1,5 % veće u odnosu na predobradu kod 10 minuta zadržavanja. Ksilan je ovdje najmanji te se razlikuje od druge najmanje vrijednosti za 0,4 % (10 minuta zadržavanja). Efikasnosti procesa predobrade za pojedine šećere za eksperiment s 0,5 %-tnom kiselinom najveće su u sva četiri eksperimenta. Za glukan iznosi 16,79 % što je za 3 % više od predobrade s 1 %-tnom kiselinom i istim vremenom zadržavanja, za ksilan je za otprilike 12 % veće u odnosu na najvećih 12,98 % u eksperimentu s istom koncentracijom kiseline i 1 minutom zadržavanja i iznosi 24,77 %.



## 5. RASPRAVA

Izračunata efikasnost dobivanja arabinana pri 0,5 %-tnoj  $\text{H}_2\text{SO}_4$  iznosi 33,95 % te je skoro dva puta veća od najmanje efikasnosti za 1 %-tnu kiselinu (1 minuta zadržavanja) i za otprilike 9 % veća od najveće efikasnosti za istu koncentraciju kiseline.

## **ZAKLJUČAK**

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata prikazanih u ovome radu mogu se izvući slijedeći zaključci:

1. Analizom pšenične slame utvrđen je slijedeći sastav: 43,70 % glukana, 21,83 % ksilana, 3,37 % arabinana, 0,27 % lignina topivog u kiselini, 1,65 % octene kiseline, 0,85 % furana te 6 % pepela.
2. Postupak predobrade pšenične slame kod 210 °C i 20 bara uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta i 0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao katalizatora, pokazao se kao najuspješniji jer su dobivene najveće ukupne koncentracije fermentabilnih šećera (13,89 % w/w) uz relativno mali udjel nusprodukata predobrade u tekućoj fazi hidrolizata. U čvrstoj fazi hidrolizata u tim uvjetima određeno je 37,04 % glukana. Ostali šećeri kao i inhibitori fermentacije nisu detektirani u čvrstoj fazi.
3. Produljenje vremena zadržavanja uz povećanje koncentracije H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tijekom predobrade pšenične slame povezano je sa smanjenjem udjela fermentabilnih šećera odnosno povećanjem udjela nusprodukata predobrade.
4. Na osnovi rezultata ovog istraživanja vidljivo je da je neophodno provesti daljnji postupak optimizacije procesa predobrade pšenične slame s ciljem povećanja udjela fermentabilnih šećera u tekućoj fazi hidrolizata kako bi se taj hidrolizat mogao primijeniti u procesu proizvodnje bioetanola.

## **LITERATURA**

## 7. LITERATURA

1. Abbasi S. A., Abbasi T., Tauseef M. S., (2011) *Biogas Energy*, Springer, London.
2. Agarwal, A. K. (2007) *Biofuels (Alcohols and Biodiesel) Applications as Fuels for Internal Combustion Engines*, *Progress in Energy and Combustion Science* 33:3, Elsevier, SAD, str. 233 - 271.
3. Alriksson B., Jönsson L. J., Nilvebrant N. O. (2013) *Bioconversion of Lignocellulose: Inhibitors and Detoxification*, *Biotechnology for Biofuels* 6:16, BioMed Ltd., London .
4. Alvira P., Ballesteros I., Ballesteros M., González A., Negro M. J. (2016) *Steam Explosion for Wheat Straw Pretreatment for Sugars Production*, *Bioethanol* 2:1, CC BY, SAD, str. 66 – 75.
5. Anonymous 1 (2013) Katzen International  
<<http://www.katzen.com/ethanol101/Lignocellulosic%20Biomass.pdf>>. Pristupljeno 1. srpnja 2016.
6. Anonymous 2, Dadax, Worldometers, <<http://www.worldometers.info/world-population>>. Pristupljeno 2. Srpnja 2016.
7. Anonymous 3 (2010) *Biofuel*, <<http://biofuel.org.uk/third-generation-biofuels.html>>. Pristupljeno 14. kolovoza 2016.
8. Anonymous 4 (2016) *Bloomberg*, <<http://www.bloomberg.com/news/articles/2013-05-21/exxon-refocusing-algae-biofuels-program-after-100-million-spend>>. Pristupljeno 14. kolovoza 2016.
9. Anonymous 5 (2011) *Biomass Magazine*, <<http://biomassmagazine.com/articles/7273/researchers-use-bacterium-to-convert-cellulose-into-n-butanol/?ref=brm>>. Pristupljeno 14. kolovoza, 2016.
10. Anonymous 6 (2016) *Biodiesel: America's Advanced Biofuel*, <<http://biodiesel.org/what-is-biodiesel/biodiesel-basics>>. Pristupljeno 14. kolovoza 2016.
11. Anonymous 7 (2009) *Conserve Energy Future*, <<http://www.conserve-energy-future.com/advantages-and-disadvantages-of-biogas.php>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2016.
12. Arora A., Lata S., Saritha M. (2012) *Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility*, *Indian Journal of Microbiology* 52:2, *Udruga mikrobiologa Indije, Indija*, str. 122 - 130.
13. Arora R., Behera S., Kumar S., Sharma N. K., Shukla M., Singh R. (2015) *Scope of Algae as Third Generation Biofuels*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 90:2, PubMed Central, SAD.
14. Arya N., Gaur A., Shrivastava A. K., Singh P., Suman A., Tiwari P., (2008) *Biological Pretreatment of Sugarcane Trash for its Conversion to Fermentable Sugars*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:5, Springer, SAD, str. 667–673.
15. Ashok, P. (2009) *Handbook of Plant Based Biofuels*, Taylor & Francis, New York.
16. Bajpai, P. (2016) *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production*, Springer, Singapur.
17. Balcu R., Burtica G., Gherman V. D., Macarie C. A., Pop R., Segneanu A. E. (2011) *Comparative Study on Microorganisms Used for the Bioethanol Production*, Scientific Research Publishing, SAD.

## 7. LITERATURA

18. Barrett D. M., Delwiche M. J., Kumar P., Stroeve P. (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48:8, ACS Publications, SAD, str. 3713 - 3729.
19. Black G., Curran H. J., Simmie J. M., Zhukov V. (2007) Bio-Butanol: Combustion Properties and Detailed Chemical Kinetic Model, *Combustion and Flame* 157, Elsevier, SAD, str. 363 - 373.
20. Blaschek H. P., Ezeji T., Scheffran J. (2010) Biofuels from Agricultural Wastes and Byproducts: An Introduction, Blackwell Publishing, SAD.
21. Boe A., Jeranyama P., Lee D. K., Owens V. N. (2007) Composition of Herbaceous Biomass Feedstocks, South Dakota State University, SAD
22. Carrere H., Rouches E., Steyer J. P., Zhou S. (2015) White-Rot Fungi Pretreatment of Lignocellulosic Biomass of Anaerobic Digestion: Impact of Glucose Supplementation, *Process Biochemistry*, Elsevier, SAD.
23. Chen, H. (2014) Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice, Chemical Industry Press, Kina.
24. Ćurić D., Janušić V., Krička T., Matin A., Voća N., (2008) Predtretmani u Proizvodnji Bioetanol iz Lignocelulozne Biomase, *Poljoprivreda* 14:1, Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek, str. 53 - 58.
25. Demirbas, A. (2008) Biofuels: Securing the Planet's Future Needs, Springer, London.
26. Dien B. S., Cotta M. A., Jeffries T. W. (2003) Bacteria Engineered for Fuel Ethanol Production: Current Status. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63:3, Springer, Njemačka, str. 258 - 266.
27. Dimmel D., Heitner C., Schmidt J. (2010) Lignin and Lignans: Advances in Chemistry, CRC Press, SAD.
28. Doshi A., Karolia A. (2016) Optimization of Enzyme Treatment for Banana Fiber, *International Journal of Textile and Fashion Technology* 6:2, SAD.
29. Dumonceaux T., Canam T., Iroba K., Tabil L., Town J. (2013) Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Using Microorganisms: Approaches, Advantages and Limitations. U: *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass- Techniques, Applications and Commercialization* (Chandel A. K., Silva S. S. ured.), CC BY, SAD.
30. Dürre, P. (2007) *Biobutanol: An Attractive Biofuel*, *Biotechnology Journal* 2:12, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Njemačka, str. 1525 – 1534.
31. EBTP (2006) European Biofuels Technology Platform, <<http://biofuelstp.eu/feedstocks.html>>. Pristupljeno 13. kolovoza 2016.
32. EBTP (2006) European Biofuels Technology Platform, <<http://www.biofuelstp.eu/butanol.html>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2016.
33. EGA (2015) European Biogas Association, <<http://european-biogas.eu/2015/12/16/biogasreport2015/>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2016.
34. Eijsink V. G. H., Horn J. S., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., (2012) Novel Enzymes for the Degradation of Cellulose, *Biotechnology for Biofuels* 5:45, BioMed Central Ltd., London.
35. Emptage M., Gray K. A., Zhao L. (2006) Bioethanol, *Current Opinion in Chemical Biology* 10:2, Elsevier, Nizozemska, str. 141 - 146.

## 7. LITERATURA

36. EPA (1970) Environmental Protection Agency, <<https://www.epa.gov/ghgemissions/global-greenhouse-gas-emissions-data>>. Pristupljeno 13. kolovoza 2016.
37. EPA (2010) Environmental Protection Agency, <<https://www3.epa.gov/otaq/models/biodsl.htm>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2016.
38. Fan L. T., Gharpuray M. M., Lee Y. H. (2011) Cellulose Hydrolysis, *Biotechnology Monographs* 3, Springer, Njemačka.
39. Galbe M., Jakobsson E. L., Linda M., Zacchi G. (2008) Steam Pretreatment of Dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Impregnated Wheat Straw and SSF With Low Yeast and Enzyme Loadings for Bioethanol Production, *Biomass and Bioenergy* 32, Elsevier, London, str. 326 – 332.
40. Gao Y., Masera O., Pacheco P., Skutsch M. (2011) A Global Analysis of Deforestation Due to Biofuel Development, Center for International Forestry Research, Indonezija.
41. García V., Keiski R. L., Muurinen E., Ojamo H., Pääkkilä J. (2011) Challenges in Biobutanol Production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15, Elsevier, SAD, str. 964 - 980.
42. Grant R., Incledon B., Pratibha S., Polson C., Raguvaran V. (2002) Optimization of Protein Precipitation Based Upon Effectiveness of Protein Removal and Ionization Effect in Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography B* 785, Elsevier, SAD.
43. Gupta V. K., Maki M., Mazutti M. A., Schmoll M., Tuohy M., (2013) Applications of Microbial Engineering, Taylor & Francis, SAD.
44. Hadar, Y. (2013) Sources for Lignocellulosic Raw Materials for the Production of Ethanol, U: *Lignocellulose Conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production* (Faraco, V., ured.), Springer, Njemačka, str. 21 - 38.
45. Hamid S. B. A., Lee H. V., Zain S. K. (2014) Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process, *Scientific World Journal* 2014, Hindawi Publishing Corporation, Egipt.
46. Hinshaw J., Stearns P. N. (2014) Industrialization in the Modern World: From the Industrial Revolution to the Internet, ABC-CLIO, Kalifornija.
47. Hu, T. Q. (2002) Chemical Modification, Properties and Usage of Lignin, Springer, SAD.
48. IGU (2015), Biogas-from refuse to energy, IGU – International Gas Union, <[http://www.igu.org/sites/default/files/node-page-field\\_file/IGU%20Biogas%20Report%202015.pdf](http://www.igu.org/sites/default/files/node-page-field_file/IGU%20Biogas%20Report%202015.pdf)>. Pristupljeno 15. kolovoza 2016.
49. Jäger A., Kahr H., Lanzerstorfer C. (2012) Bioethanol Production from Steam Explosion Pretreated Straw, Fakultet primjenjenih znanosti Upper, Austrija.
50. Jönsson L. J., Martín C. (2016) Pretreatment of Lignocellulose: Formation of Inhibitory By-Products and Strategies for Minimizing their Effects, *Bioresource Technology* 199, Elsevier, SAD, str. 103 - 112.
51. Kennedy J. F., Marwaha S. S., Panesar P. S. (2006) *Zymomonas mobilis*: An Alternative Ethanol Producer, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81:4, John Wiley & Sons, SAD, str. 623 - 635.
52. Landeka-Dragičević, T. (2015) Biotehnologija u Zaštiti Okoliša, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb.

## 7. LITERATURA

53. Lazić M. L., Rašković S., Stanković M. Z., Veljković V. B. (2004) Enzimaska Hidroliza Škroba i Dobijanje Etanola, Tehnološki fakultet, Srbija.
54. Liu H., Wang G., Zhang J. (2013) The Promising Fuel-Biobutanol, InTech, Austrija.
55. Mabee W., Saddler J., Sims R., Taylor M. (2008) International Energy Agency, From 1<sup>st</sup>- to 2<sup>nd</sup>- Generation Biofuel Technologies, OECD/IEA, Francuska.
56. Mayatulikhma M. Z., Nurulhuda I., Poh R., Rusop M. (2013) Evaporated Ethanol as Precursor for Carbon Nanotubes Synthesis, Trans Tech Publications, Malezija.
57. Moan J. L., Smith Z. A. (2007) Energy Use Worldwide: A Reference Handbook, ABC-CLIO, Kalifornija.
58. Mousdale, D.M. (2008) Biofuels: Biotechnology, Chemistry and Sustainable Development, Taylor & Francis, London.
59. Navi P., Sandberg D. (2012) Thermo-Hydro-Mechanical Processing of Wood, EPFL Press, Švicarska
60. Nijaguna, B. T. (2002) Biogas Technology, New Age International, Indija.
61. Pimentel, D. (2008) Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems: Benefits and Risks, Springer, SAD.
62. Ramey D., Yang S. T. (2004) Production of Butyric Acid and Butanol from Biomass, U.S. Department of Energy, SAD.
63. Rezić, T. (2012) Industrijska biotehnologija, Biotehnološka Proizvodnja Biogoriva, 1.izd., Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
64. Schobert, H. H. (2013) Chemistry of Fossil Fuels and Biofuels, Cambridge University Press, New York.
65. Stewart, D. (2008) Lignin as a Base Material for Materials Applications: Chemistry, Application and Economics, *Industrial Crops and Products* 27:2, Elsevier, SAD, str. 202 - 207.
66. Tabac, J. (2009) Biofuels, Facts on File Inc., New York.
67. TWB (2016) International Energy Agency Statistics. TWB- The World Bank, <<http://data.worldbank.org/indicator/EG.USE.COMM.FO.ZS>>. Pristupljeno 13. kolovoza 2016.
68. USDA (2003) Foreign Agricultural Service, Global Agricultural Information Network, USDA – United States Department of Agriculture, <[http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Biofuels%20Annual\\_Sao%20Paulo%20ATO\\_Brazil\\_9-12-2013.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Biofuels%20Annual_Sao%20Paulo%20ATO_Brazil_9-12-2013.pdf)>. Pristupljeno 3. srpnja 2016.
69. USDA (2016) Economic Research Service, USDA – United States Department of Agriculture, <<http://www.ers.usda.gov/topics/farm-economy/bioenergy/biofuel-feedstock-coproduct-market-data.aspx#Biodiesel>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2016.
70. USDE (1991) Alternative Fuels Data Center, USDE – United States Department of Energy, <[http://www.afdc.energy.gov/fuels/ethanol\\_feedstocks.html](http://www.afdc.energy.gov/fuels/ethanol_feedstocks.html)>. Pristupljeno 2. srpnja 2016.
71. USDE (1991) Alternative Fuels Data Center, USDE – United States Department of Energy, <<http://www.afdc.energy.gov/data/categories/fuels-infrastructure>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2016.
72. Wagner, L. (2015) Trends from the Use of Biogas Technology in Germany, German Biogas Association, Germany

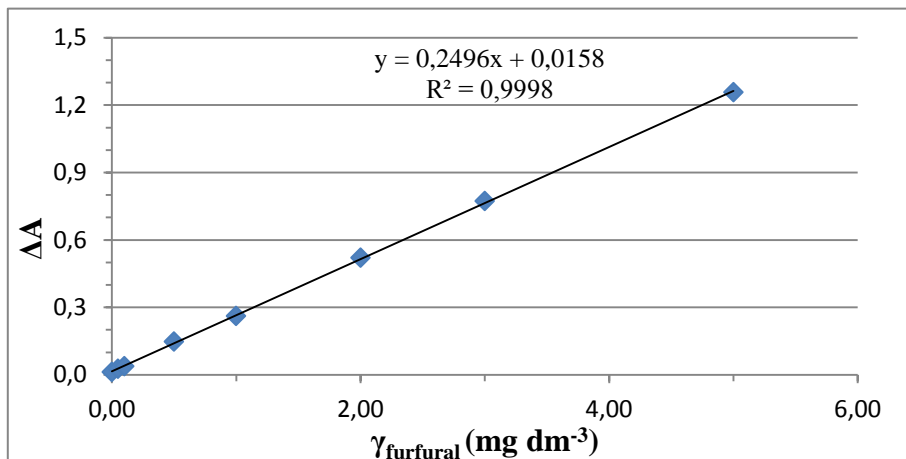


## 7. LITERATURA

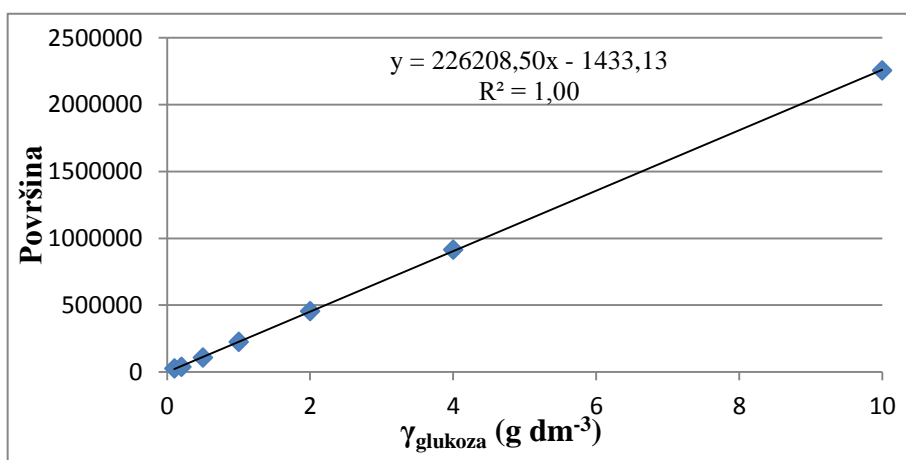
73. Walker, G. M. (2010) *Bioethanol: Science and Technology of Fuel Alcohol*, 1. izdanje, Bookboon, Danska.
74. Wyman, C. E. (1996) *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Taylor & Francis, London.



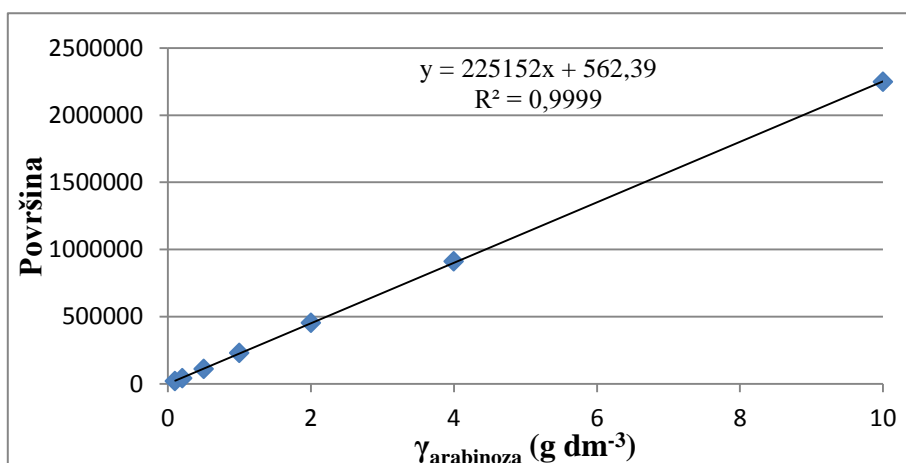
8. PRILOG



Slika 15. Baždarni dijagram furana

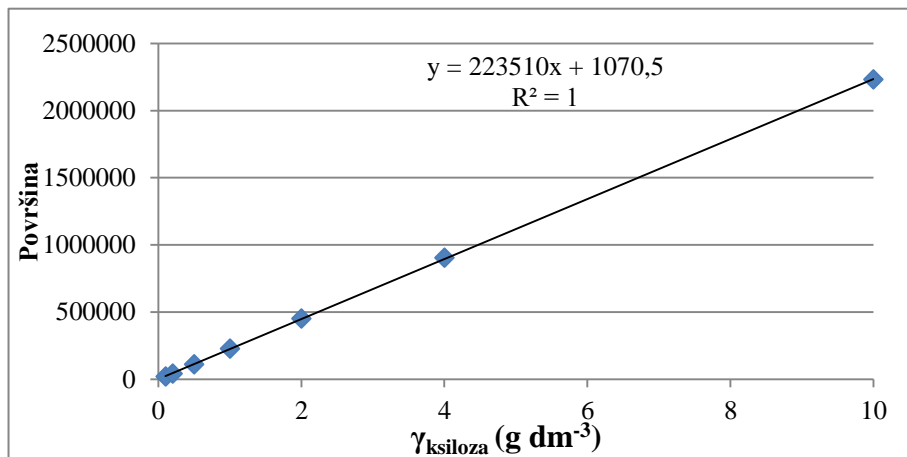


Slika 16. Baždarni dijagram glukoze

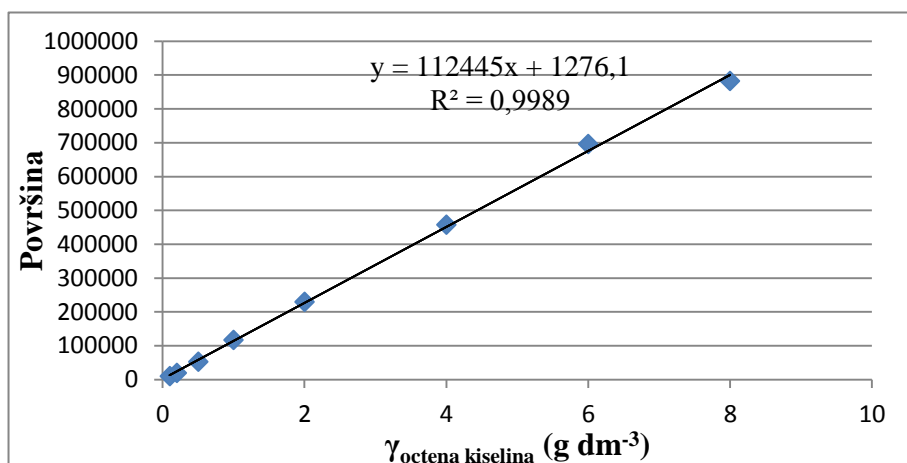


Slika 17. Baždarni dijagram arabinoze

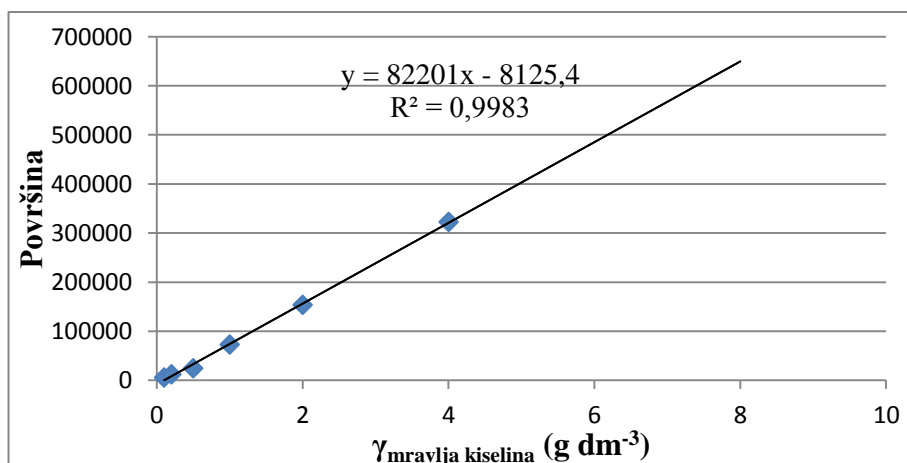
## 8. PRILOG



Slika 18. Baždarni dijagram ksiloze

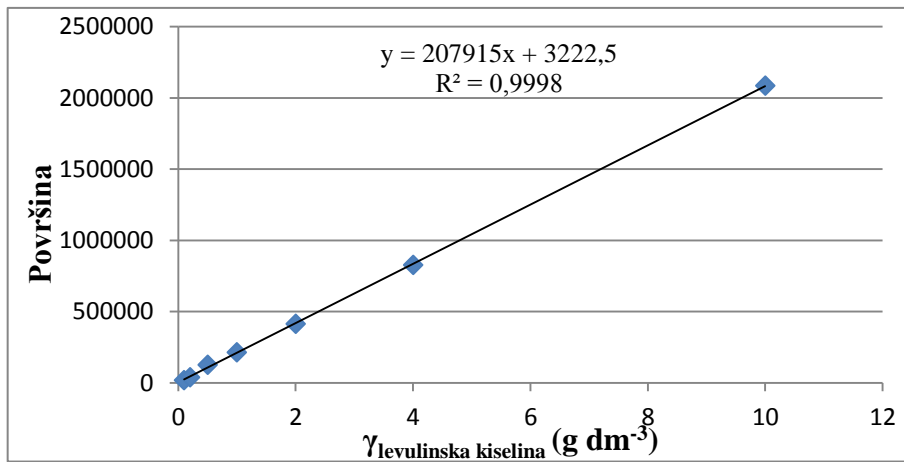


Slika 18. Baždarni dijagram octene kiseline



Slika 19. Baždarni dijagram mravlje kiseline

8. PRILOG



Slika 20. Baždarni dijagram levulinske kiseline