

Utjecaj veličine čestica na razgradnju lignoceluloznih sirovina

Mrak, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:569677>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Karla Mrak

6745/BT

**UTJECAJ VELIČINE ČESTICA NA RAZGRADNJU
LIGNOCELULOZNIH SIROVINA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 3

Mentor: *izv. prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac*

Zagreb, 2017.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr.sc. Vlatki Petravić Tominac na pomoći i savjetima pri izradi ovog rada.

TEMELJNA 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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj veličine čestica na razgradnju lignoceluloznih sirovina

Karla Mrak 6745/BT

Sažetak: Pojam lignoceluloznih materijala odnosi se na biljnu biomasu koja uključuje poljoprivredne ostatke, šumski i drveni otpad, otpad koji nastaje u prehrambenoj industriji te komunalni otpad. Ove sirovine sastoje se od celuloze, hemiceluloze i lignina, a postoji sve veći interes za njihovu biotehnološku primjenu za dobivanje različitih proizvoda (npr. organskih kiselina, enzima, biogoriva, antibiotika, mikrobne biomase i biopesticida). Zbog složene strukture lignoceluloznih sirovina, prije početka biotehnološkog procesa potrebna je odgovarajuća predobrada. Veličina čestica sirovina može utjecati na ekonomičnost biotehnološkog procesa koji se temelji na lignoceluloznim sirovinama jer utječe na prinos, potrošnju energije i troškove cjelokupnog procesa. Potrebne dimenzije čestica ovise o odabranoj metodi predobrade i korištenoj sirovini, a usitnjavanje čestica provodi se mehaničkim postupcima, poput rezanja, sjeckanja i mljevenja, koji su energetski zahtjevniji. Stoga je za svaki pojedini proces važno izabrati najefikasniji i najisplativiji proces usitnjavanja.

Gljučne riječi: lignoceluloza, razgradnja, usitnjavanje, veličina čestica

Rad sadrži: 44 stranice, 9 slika, 7 tablica, 56 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr.sc. Vlatka Petravić Tominac

Rad predan: rujan 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Brewing

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology or Biotechnology

Influence of particle size on degradation of lignocellulosic raw materials

KarlaMrak, 6745/BT

Abstract: The term lignocellulosic material refers to plant biomass which includes agricultural residues, forest and wood waste, waste generated in the food industry and communal waste. These raw materials consist of cellulose, hemicellulose and lignin, and there is an increasing interest for their biotechnological application to obtain various products (eg. organic acids, enzymes, biofuels, antibiotics, microbial biomass and biopesticides). Because of the complex structure of lignocellulosic raw materials, proper pretreatment is needed prior to the biotechnological process. The particle size of the raw material can affect the economics of a biotechnological process based on lignocellulosic raw materials because it affects yield, energy consumption and costs of the entire process. The required particle dimensions depend on the pretreatment method and raw material used, and the size reduction is carried out by mechanical procedures such as cutting, hacking and milling, which are energy-intensive. Therefore, it is important to choose the most efficient and most cost-effective way of size reduction.

Keywords: lignocellulose, degradation, size reduction, particle size

Thesis contain: 44 pages, 9 figures, 7 tables, 56 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph.D. Vlatka Petravić Tominac, Associate Professor

Thesis delivered: September 2017.

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO..... | 2 |
| 2.1. Potreba za definiranjem dimenzija čestica lignoceluloznih sirovina | 2 |
| 2.2. Pregled strukture i enzimске razgradnje lignoceluloze | 4 |
| 2.2.1. Celuloza..... | 5 |
| 2.2.2. Hemiceluloza | 5 |
| 2.2.3. Lignin..... | 6 |
| 2.2.4. Prostorna struktura lignoceluloze..... | 7 |
| 2.3. Energetske potrebe za usitnjavanje čestica | 9 |
| 2.4. Utjecaj veličine čestica na razgradivost celuloze | 13 |
| 2.5. Utjecaj veličine čestica na termokemijsku predobradu biomase | 19 |
| 2.5.1. Predobrada razrijeđenom kiselinom | 20 |
| 2.5.2. Parna eksplozija | 22 |
| 2.5.3. Druge metode predobrade | 24 |
| 2.6. Predobrada lignoceluloznih sirovina dostupnih u republici Hrvatskoj | 25 |
| 3. ZAKLJUČCI | 39 |
| 4. LITERATURA | 40 |

Lignocelulozni materijali su glavna komponenta biomase i predstavljaju najobilniji obnovljivi izvor energije dostupan na Zemlji (Taherzadeh i Karimi, 2008). Nastaju kao sekundarni proizvodi u drvnj i prehrambenoj industriji, a uključuju različite poljoprivredne ostatke (npr. pšenični, repini i kukuruzni ostaci, pulpa šećerne repe, sijeno, zelena i suha trava) i ostatke drvene biomase (npr. piljevina i ostaci drva) (Sun i Cheng, 2002). Primjeri ovih sirovina dostupni za područje Republike Hrvatske su kukuruzovina, kukuruzni oklasci, kukuruzna komušina, pšenična i ječmena slama, lisne rozete šećerne repe, ostaci rezidbe maslinika i voćnjaka te bukova piljevina (Buljubašić, 2012).

Ove sirovine se sastoje od celuloze, hemiceluloze i lignina a njihov udio ovisi o vrsti biljke. Celuloza i hemiceluloza su glavni sastojci stanične stijenke biljnih stanica. Celuloza, koja čini 40-60 % lignoceluloze, ima kristalnu strukturu koju grade molekule D-glukoze povezane u dugačke lance β -1,4-glukozidnim vezama. Hemiceluloza se sastoji od različitih šećera, a lignin predstavlja kompleks polimera koji stvaraju zaštitni sloj oko celuloze i hemiceluloze (Palonen, 2004).

Mogućnosti korištenja lignoceluloznih materijala su brojne pa se tako mogu koristiti za proizvodnju bioplina, bioetanol, organskih kiselina, enzima, mikrobnе biomase te u bioremedijaciji i mnogim drugim biotehnoškim postupcima. Lignocelulozni materijali su teško razgradivi zbog svoje kompleksne strukture. Stoga je prije korištenja potrebna predobrada, koja ovisi o procesu. Metode predobrade su fizikalne, fizikalno-kemijske, kemijske i biološke. Svrha predobrade lignoceluloze je da se ukloni lignin i smanji udio kristalne strukture celuloze (Alriksson, 2006).

Stoga su ciljevi ovog završnog rada:

- objasniti utjecaj veličine čestica lignoceluloznih sirovina na procese predobrade koji se provode u biotehnologiji
- navesti primjere utjecaja veličine čestica

Pritom je posebna pažnja posvećena sirovinama koje su najzastupljenije u našem podneblju i ekonomski najzanimljivije u Republici Hrvatskoj (kukuruzovina, kukuruzni oklasci i pšenična slama).

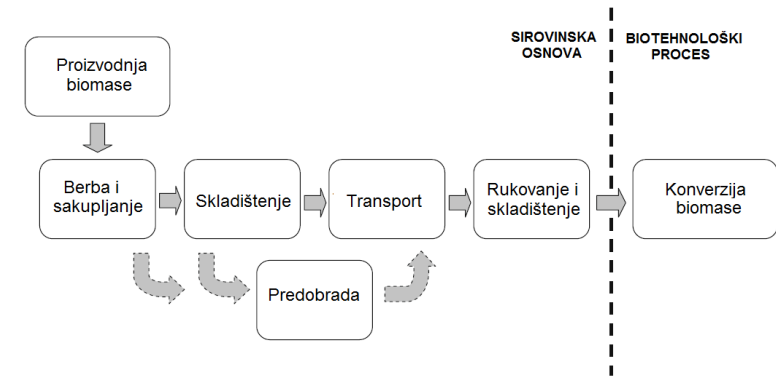
2.1. Potreba za definiranjem dimenzija čestica lignoceluloznih sirovina

Veličina čestica sirovina može utjecati na ekonomičnost biotehnoške proizvodnje koja se temelji na lignoceluloznim sirovinama jer utječe na prinos i na energetske troškove (Vidal i sur., 2011). Na primjeru proizvodnje bioetanola pokazalo se da veličina čestica u ograničenoj mjeri utječe na enzimsku razgradnju biomase. Usitnjavanje je omogućilo povećanje razine pretvorbe do maksimalno $\approx 50\%$ dok su kemijske modifikacije omogućile konverziju veću od 70% neovisno o veličini čestica biomase. To sugerira da je mehanička predobrada sama po sebi nedovoljna da se postigne ekonomski isplativa konverzija biomase te je stoga nužnu veličinu čestica potrebno odrediti ovisno o termokemijskoj predobradi korištenoj za pretvorbu lignoceluloze.

1. Maksimalna veličina čestica potrebna za neku predobradu je ona ispod koje ne dolazi do porasta efikasnosti predobrade, a određena je tako da se odredi enzimska razgradnja nakon predobrade.
2. Istraživanja termokemijske predobrade, koja su u obzir uzela veličinu čestica, ponudile su široki raspon maksimalnih veličina koji je iznosio od $< 0,15$ do 50 mm.
3. Maksimalne veličine ovise o korištenoj metodi predobrade te se raspon dimenzija čestica smanjuje kako sljedeći: eksplozija pare > obrada toplom vodom > predobrada razrijeđenom kiselinom ili lužinom. Također ovise o korištenoj sirovini, tako da zeljaste biljke i trava pokazuju manji raspon maksimalnih veličina (< 3 mm) nego drvenasta biomasa (> 3 mm). Takvi trendovi, razmatrani uz velike energetske potrebe usitnjavanja, jamče sustavnije istraživanje utjecaja veličine čestica na različite tehnologije predobrade i na različite sirovine, kao uvjet za optimiziranje sustava opskrbe sirovinama.

Vidal i sur. (2011) opisuju utjecaj veličine čestica na konverziju čestica lignoceluloze na primjeru proizvodnje bioetanola. Pretvorbom biomase u tekuća goriva, SAD planira zamijeniti 30% trenutno korištene nafte ili oko $2,3 \cdot 10^8$ m³ godišnje. 2008. godine proizveli su $3,4 \cdot 10^7$ m³ etanola gotovo u cijelosti iz kukuruza. Pothvat takvih razmjera zahtjeva tehnološke i ekonomske iskorake, pri čemu je cijena sirovine kritični faktor.

Primjenjuje se sustavni inženjerski pristup za optimizaciju opskrbe biomasom (Slika 1). Donošenje odluka vezanih uz predobradu sirovina treba biti u skladu sa zahtjevima konverzije biomase, ili preciznije, ovisno o željenom obliku sirovine koja ulazi u sam biotehnoški proces.



Slika 1. Shematski prikaz sustava opskrbe sirovinom (Vidal i sur., 2011).

Iako mnoge fizikalne karakteristike mogu biti značajne kod predobrade biomase, ovaj rad se primarno fokusira na veličinu čestica iz sljedećih razloga (Vidal i sur., 2011):

1. Smanjenje veličine čestica provodi se mehaničkim postupcima (primjerice rezanjem, sjeckanjem, mljevenjem trenjem, kompresijom) koje je jednostavno primijeniti tijekom ili nakon žetve. Među fizičkim karakteristikama, veličinu čestica je najjednostavnije modificirati u fazi opskrbe i ona se možda najmanje modificira kasnijom kemijskom obradom
2. Usitnjavanje ili smanjivanje dimenzija je energetski zahtjevan proces koji značajno utječe na cijenu sirovina.
3. Veličina čestica utječe na skladištenje i transport biomase (npr. nasipna gustoća je funkcija veličine čestica).

Dva glavna načina predobrade biomase su termokemijska i biološka predobrada, a veličina čestica utječe na obje vrste postupka. Ovaj rad razmatra jedino biokemijsku pretvorbu biomase u etanol, koja je vrlo blizu komercijalne primjene, dok druge metode predobrade sirovina, poput likvefakcije i peletizacije, koje su više vezane uz termokemijsku predobradu, nisu razmatrane. Iako je povećanje gustoće (tj. peletizacija i briketiranje) pogodno rješenje za probleme skladištenja i transporta, njegova primjena nije razmatrana sa stajališta biokonverzije, vjerojatno zato jer usitnjavanje neposredno prije predobrade ne bi bilo ekonomski isplativo. U daljnjoj raspravi pojam hidroliza ili digestibilnost celuloze označava razgradnju celuloze do šećera, a konverzija celuloze označava proizvodnju šećera ili etanola i u tom slučaju će biti naveden proizvod pretvorbe (Vidal i sur., 2011).

2.2. Pregled strukture i enzimske razgradnje lignoceluloze

Lignoceluloza se sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina i glavna je strukturna komponenta stanične stijenke biljke (Palonen, 2004). Pojam lignoceluloznih materijala odnosi se na biljnu biomasu koja uključuje poljoprivredne ostatke kao npr. pšenična slama (eng. wheat straw), kukuruzovina (eng. corn stover) i oklasci kukuruza (eng. corn cob) te šumski i drvni otpad kao što su piljevina te usitnjeni ostaci drveća. Kao lignocelulozni materijal također se može koristiti komunalni otpad (npr. otpadni papir) te otpad koji nastaje u prehrambenoj industriji (otpad uljarica, ostaci voća i povrća). Lignoceluloza je jedan od najčešćih biopolimera u prirodi (Palonen, 2004) i još uvijek predstavlja nedovoljno iskorištenu biotehnošku sirovinu.

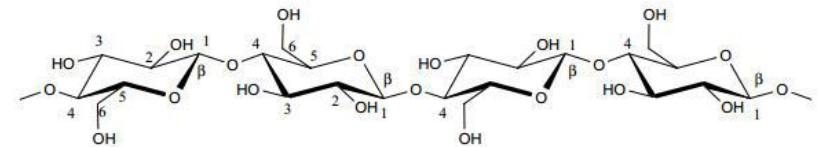
U Tablici 1. prikazan je sastav nekih lignoceluloznih sirovina koje su karakteristične i za naše podneblje. Vidljivo je da stabljika kukuruza, u odnosu na klip kukuruza, slamu pšenice i trave, sadrži najmanji udio lignina, što znači da je i najpogodnija sirovina za obradu.

Tablica 1. Udio celuloze, hemiceluloze i lignina u nekim poljoprivrednim ostacima (Sun i Cheng, 2002).

| Lignocelulozni materijal | Celuloza [%] | Hemiceluloza [%] | Lignin [%] |
|--------------------------|--------------|------------------|------------|
| Stabljika kukuruza | 28 | 28 | 11 |
| Klip kukuruza | 45 | 35 | 15 |
| Slama pšenice | 30 | 50 | 15 |
| Trave | 25 - 40 | 35 - 50 | 10 - 30 |

2.2.1. Celuloza

Celuloza (Slika 2) se sastoji od podjedinica glukoze povezanih pomoću β -1,4- glikozidnih veza. Celuloza koja je prisutna u biljkama sastoji se od organiziranih regija s kristalnom strukturom i regija s amorfnom strukturom koji nisu dobro organizirani. Celulozne niti su međusobno povezane i tvore celulozne fibrile ili snopove. Takve celulozne fibrile su uglavnom samostalne i slabo povezane vodikovim vezama (Hendriks i Zeeman, 2009).

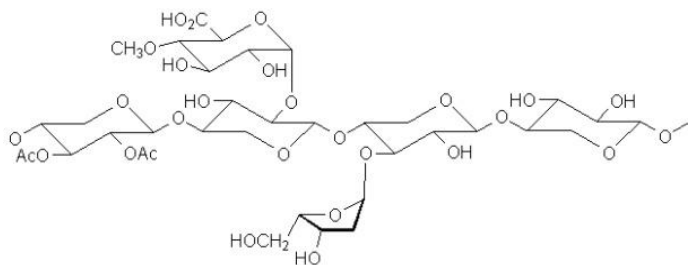


Slika 2. Struktura celuloze (Laine, 2005).

2.2.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza (Slika 3) je kompleksni ugljikohidrat građen od različitih polimera poput pentozu (ksilozu i arabinozu), heksozu (manozu, glukozu i galaktozu) i šećernih kiselina. Dominantna komponenta hemiceluloze, u tvrdom drvu i poljoprivrednim biljkama, poput trave i slame, je ksilan, a u mekom drvu glukomanan. Hemiceluloza ima manji molekularnu masu od celuloze i ogranke sa kraćim krajnjim lancima koji sadrže različite šećere, koji se lagano

hidroliziraju. Hemiceluloza služi kao veza između lignina i celulozних vlakana i daje krutost cijeloj celuloza-hemiceluloza-lignin strukturi. Topljivost hemicelulozних komponenata pada prema sljedećem rasporedu: manoz, ksiloza, glukoza, arabinoza i galaktoza. Topljivost se povećava s povećanjem temperature. Topljivost hemicelulozних komponenata u vodi počinje kod 180 °C kod neutralnih uvjeta, ali i kod 150 °C dijelovi hemiceluloze se otapaju. Topljivost lignocelulozних komponenata nije ovisna samo o temperaturi, već i o drugim faktorima poput vlažnosti, pH. Ksilan se iz hemiceluloze može dobro izdvojiti u kiselim ili lužnatim uvjetima, a glukomanan se teško izdvaja u kiselim uvjetima i potrebni su mu lužnatiji uvjeti od ksilana. Prema tome ksilan je dio hemiceluloze koje se može najjednostavnije izdvojiti. U odnosu na celulozu i lignin, hemiceluloza je najviše termo-kemijski osjetljivija, tijekom termokemijske predobrade prvo će reagirati bočne grupe, a nakon toga osnovni kostur hemiceluloze (Hendriks i Zeeman, 2009).

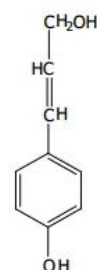


Slika 3. Struktura hemiceluloze (Laine, 2005).

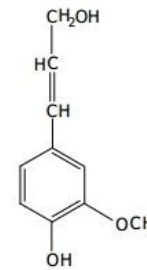
2.2.3. Lignin

Lignin je nakon celuloze i hemiceluloze, jedan od najrasprostranjenijih polimera u prirodi koji je prisutan u staničnoj stijenci biljaka. To je amorfni heteropolimer, izgrađen od tri fenilpropane jedinice (*p*-kumaril-alkohol, koniferil-alkohol i sinapil-alkohol, Slika 4), međusobno povezane različitim vrstama vezama. Glavna svrha lignina je osigurati biljci strukturnu potporu, nepropusnost, otpornost na mikroorganizme i oksidativni stres. Lignin nije topljiv u vodi i optički je aktivan, zbog čega ga je vrlo teško razgraditi. Lignin, baš kao i hemiceluloza, obično se počinje rastapati u vodi oko 180°C u neutralnim uvjetima. Topljivost

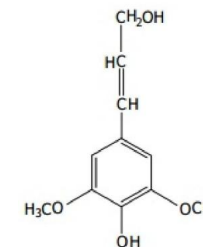
lignina u kiseloj, neutralnoj ili lužnatoj sredini ovisi o udjelu navedenih prekursora lignina ili njihovoj kombinaciji (Hendriks i Zeeman, 2009).



p-kumaril-alkohol
(*p*-hidroksicinamil-alkohol,
4-hidroksicinamil-alkohol)



koniferil-alkohol
(4-hidroksi-3- metoksinamil-
alkohol)

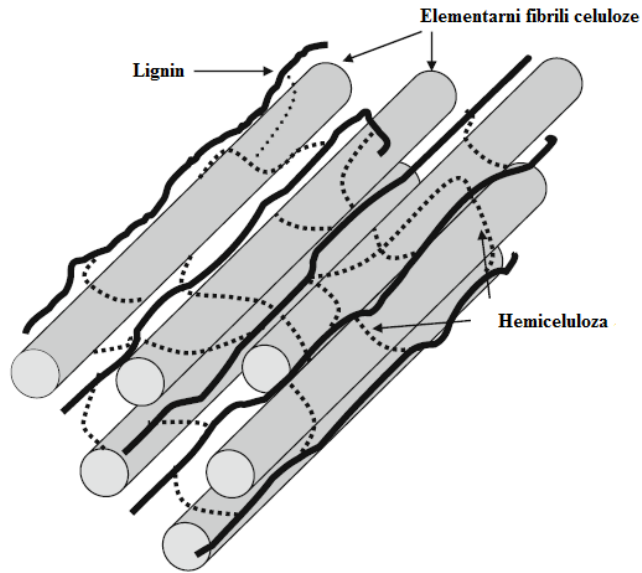


sinapil-alkohol
(4-hidroksi-3,5-
dimetoksinamil-alkohol)

Slika 4. Osnovne građevne jedinice lignina (prekursori pri biosintezi lignina) (Harmsen i sur., 2010).

2.2.4. Prostorna struktura lignoceluloze

Celuloza je organizirana u elementarne fibrile koji se sastoje od 36 lanaca glukana u 3,0×5,5 nm heksagonalnoj projekciji. Takva prostorna struktura koja nastaje zbog slojeva β -1,4 glukanskih lanaca naslaganih jednih na druge daje celulozi kristalna svojstva. Elementarni fibrili celuloze okružen su hemiceluloznim molekulama koje tvore gel matricu vezanjem nekovalentnim ili kovalentnim vezama sa celuloznim i drugim hemiceluloznim molekulama. Lignin se smatra hidrofobnim punilom čija se biosinteza odvija kasno tijekom sinteze biljnih vlakana, pri čemu se istiskuje voda i osigurava se matrica lignina koja prekriva celulozna vlakna. Kovalentno i unakrsno povezivanje lignina s drugim polisaharidima (prvenstveno hemicelulozom) ograničava dostupnost enzimima koji razgrađuju ugljikohidrate (polisaharide) i onemogućava ekstrakciju polisaharida neutralnim razrijeđenim vodenim otapalima (Slika 5) (Vidal i sur., 2011).



Slika 5. Struktura i organizacija lignoceluloze (Vidal i sur., 2011).

Niz fizikalnih karakteristika povezanih sa strukturom lignoceluloze utječe na otpornost biomase na enzimsku hidrolizu. Neke od njih su: (Vidal i sur., 2011, Taherzadeh i Karimi, 2008).

1. Kristaličnost - mjerena kao indeks kristaličnosti ili omjer kristalnog i amornog djela (eng. crystallinity, CI);
2. Stupanj polimerizacije ili duljina lanca glukana (eng. degree of polymerization, DP);
3. Specifična površina (eng. specific surface area);
4. Dostupnost površine ili volumen pora (eng. pore volume);
5. Veličina čestica (eng. accessible surface area)

Istraživanja često pokazuju različite rezultate o stupnju utjecaja pojedinih fizikalnih svojstava na izdržljivost biomase. Mogući razlozi takve nedosljednosti su interakcije između

svojstava zbog zajedničke osnovne strukture i kemijskih svojstava te ovisnost o okolini u kojoj se provode mjerenja (tj. radi li se o lignoceluloznom kompleksu ili izoliranom celuloznom vlaknu). Primjerice, na mjerenje CI i DP mogu utjecati necelulozne komponente te su takve veličine primjenjivije na elementarne celulozne fibrile, a ne na lignocelulozni materijal. Mjerenja površine, posebno površine dostupne enzimima, relevantna su za lignocelulozni kompleks kao što pokazuju brojna istraživanja, koja su demonstrirala snažnu povezanost ovog svojstva i enzimske razgradivosti. Međutim, vrlo je često i neizbježno da promjene jednog svojstva u procesu utječu i na druga svojstva. Fizikalna i kemijska obrada, koja mijenja površinu, mogu promijeniti druga svojstva poput CI. U tom pogledu, uklanjanje lignina i hemiceluloze poboljšava enzimsku razgradnju te se njihovim uklanjanjem može utjecati na dostupnu površinu. Dok struktura lignoceluloze ima veliku ulogu u podložnosti enzimskoj hidrolizi, karakteristike enzima su također jednako važne.

2.3. Energetske potrebe za usitnjavanje čestica

Veličina čestica biomase koja se može smanjiti procesom usitnjavanja, utječe na procese prijenosa mase i topline. Polazna lignocelulozna sirovina obično se obrađuje pogodnom metodom, poput sjeckanja zeljaste biomase ili lomljenje drvene biomase (eng. chipping). Materijal zatim prolazi kroz završno dimenzioniranje pogodno za kasniju obradu pri čemu se najčešće koriste mlinovi čekićari, rezni mlinovi i mljevenje trenjem. Usitnjavanje je energetski zahtjevan postupak, pogotovo u zadnjoj fazi dimenzioniranja, kojim se dobiva proizvod male vrijednosti. Zato postoji interes za određivanje najefikasnijeg procesa mljevenja (Vidal i sur., 2011).

Pri radu s drvenim i zeljastim materijalima (udio vlage 4 % - 7 %) veća je potrošnje energije prilikom obrade tvrdog drva i slame mlinom čekićarom nego pri obradi kukuruzovine (potrošnja za rezni mlin je bila 20 kWh/t, dok je potrošnja za mlin čekićar bila 9,6 kWh/t, za smanjenje veličine do 7 puta) Obrada tvrdog drva imala je za jedan cijeli red veličine veće energetske zahtjeve u odnosu na slamu i kukuruzovinu. Zaključeno je da se energetska potrošnja može ograničiti na 30kWh/t, sve dok se konačna veličina čestica održava između 3 i 6 mm. U navedenom istraživanju nije bilo analizirana raspodjela čestica po veličini (Vidal i sur., 2011).

Himmel i sur., 1985 su kvantificirali raspodjelu veličine čestica je dobivenih usitnjavanjem: strugotina jasike (6 % vlage), pšenične slame (4 % vlage), kukuruzovina (7 % vlage) i kukuruznih oklasaka (7 % vlage) pomoću mlinova čekićara, reznih mlinova i mljevenja trenjem. Koristeći mlinove čekićare i mljevenje trenjem dobivene su veće količine finijeg proizvoda (prolaze kroz otvore od 0,25 mm) nego reznim mlinom, koji je imao najmanju specifičnu energetska potrošnju (specifična energija potrošena za prazni hod). Kod obrade strugotina jasike, korištenjem 1/16 inch (159 mm) sita, mljevenje trenjem potrošilo je > 200 kWh/t, dok su mlin čekićar i rezni mlin potrošili između 100 i 150 kWh/t. Koristeći sito 1/14 inch (6,35 mm), specifična energetska potrošnja mlina čekićara smanjila se na \approx 100 kWh/t, a potrošnja reznog mlina na <30 kWh/t. Vrsta biomase je još jedan važan faktor, što je vidljivo u potrošnji energije za mljevenje pšenične slame. Potrošeno je \approx 50 kWh/t za mlin čekićar i < 10 kWh/t za rezni mlin koristeći sito 1/16 inch (1,59 mm).

Provedena su istraživanja mljevenja drvenih strugotina visoke vlažnosti (udio vlage od \approx 60 %) koristeći mlin čekićar i mlin sa diskovima. Kod primjene polaznih materijala visoke vlažnosti potrebno je prethodno sušenje materijala, što predstavlja dodatne energetske troškove, te se javljaju problemi poput niske brzine proizvodnje, prekomjernog zagrijavanja, začepjenja sita, oštećenja opreme. Zaključeno je da se korištenjem mlinova sa diskovima dobivaju manje čestice (> 80 % w/w ispod 2,5 mm) u usporedbi s mlinovima čekićarima (> 80 % w/w ispod 3,5 mm) ali zahtijevaju više energije (od 134 do 669 kWh/t ovisno o tipu i načinu rada) nego mlinovi čekićari (od 88 do 112 kWh/t). Potrošena energija umanjena je za prazni hod, ali je uračunata energija potrošena na rashladni ventilator i proizvodnju pare u slučaju tlačnih mlinova s diskovima. Potrošnja energije je općenito bila veća od prethodno utvrđenih za osušeno drvo, što potvrđuje da usitnjavanje biomase visoke vlažnosti zahtijeva više energije (Vidal i sur., 2011).

Novija istraživanja usredotočena su na mlinove čekićare. Četiri vrste biomase (pšenična i ječmena slama, kukuruzovina i ukrasno proso) podvrgnute su mljevenju mlinom čekićarom s tri vrste sita (3,2, 1,6 i 0,8 mm). Zatim je utvrđen udio vlage i veličina čestica, te je najveće specifične energetske zahtjeve imalo ukrasno proso, zatim pšenična i ječmena slama, a kukuruzovina je imala najmanje. Do takvih razlika u energetske zahtjevima navedenih biljnih materijala došlo je vjerojatno zbog strukturnih razlika njihovih celuloznih fibrila, iako to nije detaljno istraženo. Upotrebom otvora sita od 1,6 mm, pri početnoj vlažnosti od 6,2 % i 8,3 %,

izmjereni su specifični energetske zahtjevi od 51,8, 37,0, 37,9 i 14,8 kWh/t za ukrasno proso, pšeničnu slamu, ječmenu slamu i kukuruzovinu. Jednoliki porast vlažnosti sirovine do 12 % dovodi do porasta potrošnje energije, osim za ječmenu slamu. Došlo je do porasta specifičnih energetske zahtjeva od 13 %, 18 % i 34 % za ukrasno proso, pšeničnu slamu i kukuruzovinu (Vidal i sur., 2011).

Korištenjem sličnih sirovina (udjela vlage od 9 %) provedena je opsežna karakterizacija raspodjele veličine čestica dobivenih postupkom prosijavanja. Proučavala se energetska potrošnja za mlin čekićar s otvorom od 3,2 mm, pri različitim brzinama mljevenja i različitim konfiguracijama čekića. Općenito, brzina nije imala velikog utjecaja ni na dobivenu veličinu čestica ni na efektivnu specifičnu energiju (definiranu kao energiju veću od energije potrebne za prazni hod). Ukupna specifična energija nije se razlikovala za tri sirovine (100 do 125 MJ/mg, što je ekvivalentno 28 do 35 kWh/t, pri najmanjoj brzini), ali kada se normalizirala za usitnjavanje (ukupna specifična energija po usitnjenju jedinici) pšenična slama je imala veće energetske zahtjeve od kukuruzovine i ukrasnog prosa, čije su vrijednosti bile jednake. Ovo je u suprotnosti s prethodnim rezultatima, koji upućuju da učinak mljevenja ne ovisi isključivo o opremi (npr. veličini i konfiguraciji) i načinu rada (npr. brzini punjenja, vlažnosti materijala, polaznoj veličini čestica) već i o metodama procjene (tj. izravnom mjerenju mehaničke energije za razliku od mjerenja električne snage) (Vidal i sur., 2011).

Kombiniranjem mlina čekićara i separatora u poluindustrijskom postrojenju ispitivana je optimalna strategija usitnjavanja drvene biomase (čips bora, borova kora i čips jasike, koje imaju udio vlage od 10 do 15 %). Željena veličina čestica bila je određena strogim zahtjevima izgaranja pulveriziranog goriva (tj. 95 % w/w čestica manjih od 1 mm i minimalno 12 % w/w manjih od 0,125 mm). Izuzev čipsa topole, utvrđeno je da se upotrebom mlina čekićara u jednom ciklusu mljevenja ne postiže željene veličine čestica. S druge strane, kod dvostupanjskog mljevenja mlinom čekićarom bez separacije prije drugog mljevenja došlo je do začepjenja u drugom mlinu. Najbolja konačna veličina čestica dobivena je upotrebom dvostupanjskog mljevenja mlinom čekićarom i dinamičke separacije kako bi se uklonile čestice već odgovarajuće veličine. Specifična energetska potrošnja (ukupna potrošnja bez praznog hoda) ne razlikuje se znatno između procesa, ali se znatno razlikuje ovisno o biomasi (85, 118 odnosno 20 kWh/t za čips jasike, bukve i bukovu koru). Samim usitnjavanjem došlo je do značajnog povećanja nasipne gustoće (za 27 % do 50 %) (Vidal i sur., 2011).

Tablica 2. Energetski zahtjevi za usitnjavanje biomase različitih lignoceluloznih sirovina (Vidal i sur., 2011).

| Biomasa | | Mehanizam usitnjavanja | Veličina čestica ^a | Specifična energija [kWh/t] | |
|--------------|------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------|
| Drvo | Tvrdo drvo | Rezni, čekićar | 1,6 mm | 130 | |
| | | Jasika | Trenje | 1,6 mm | >200 |
| | Topola | Čekićar | 1,6 mm | 100 - 150 | |
| | | | Rezni | 1,6 mm | 100 - 150 |
| | | Čekićar | < 1 mm (95 %) | 85 ^b | |
| | | Čekićar | < 1 mm (95 %) | 118 ^b | |
| | | Čekićar | < 1 mm (95 %) | 20 ^b | |
| | | Hibrid topole (visoka vlažnost) | Trenje | < 2,5 mm (> 80 %) | > 130 |
| | | | Čekićar | < 3,5 mm (> 80 %) | 88 - 112 |
| | | Zeljasto bilje | Slama | Rezni | 1,6 mm |
| Rezni | 1,6 mm | | | < 10 | |
| Čekićar | 1,6 mm | | | 42 | |
| Čekićar | 1,6 mm | | | 50 | |
| Čekićar | 1,6 mm | | | 37 | |
| Čekićar | 3,2 mm | | | 28 - 35 ^b | |
| Kukuruzovina | Rezni | | 3,2 mm | 20 | |
| | Čekićar | | 1,6 mm | 14 | |
| | Čekićar | | 1,6 mm | 15 | |
| | Čekićar | | 3,2 mm | 28-35 ^b | |
| Trava | Čekićar | | 1,6 mm | 52 | |
| | Čekićar | | 3,2 mm | 28-35 ^b | |

^a Veličine čestica su dimenzije otvora sita, osim u slučajevima kada su navedeni postoci (koji predstavljaju maseni udio materijala čije su čestice manje od navedene vrijednosti)

^b Energetske vrijednosti označene slovom b uključuju potrebe za prazan hod, dok su sve ostale vrijednosti umanjene za energiju potrebnu za prazan hod.

U prethodnoj raspravi, sažetoj u Tablici 2, energija potrebna za mljevenje biomase zeljastih biljaka do prihvatljivih dimenzija (otvor < 2 mm) je ≤ 50 kWh/t. Takva gornja granica od 50 kWh/t je ekvivalentna 2 % energije koja se može dobiti proizvedenim etanolom. Kako bi se postiglo slično smanjenje veličine čestica drvene biomase, potrebno je upotrijebiti barem dvostruku količinu energije. Da bi se smanjili ukupni energetski troškovi procesa potrebno je poboljšati efikasnost mljevenja (Vidal i sur., 2011).

Razmatrane su i alternativne metode usitnjavanja čestica (Holtzaple i sur., 1989), poput eksplozivne dekompresije, kod koje se drveni čips (25,4 × 6,4 mm) podvrgavaju pari visokog pritiska (22,4 atm, 219 °C) nakon čega slijedi naglo otpuštanje pritiska, što dovodi do toga da 50 % čestica prolazi kroz sita (20 mesh, otvori sita od 0,85 mm). Takva metoda zahtijeva samo 60 % energije korištene kod mljevenja trenjem kako bi se dobio isti porast specifične površine.

Upotreba kemijskih predtretmana prije mljevenja dovela je do poboljšanja efikasnosti mljevenja, kao u slučaju primjene mlina s diskovima, gdje je sulfitni predtretman uz korištenje jednake količine energije za mljevenje doveo do udvostručenja volumetrijske površine (Vidal i sur., 2011).

2.4. Utjecaj veličine čestica na razgradivost celuloze

Brojna istraživanja proučavala su utjecaj veličine čestica na razgradivost celuloze, no u nekima nije dokazana značajna povezanost, što ukazuje na to da je veličina čestica slab pokazatelj podložnosti enzimskoj hidrolizi. Primjerice, brzine hidrolize bile su slične za mikrokristalnu celulozu, prosječne veličine čestica od 0,038 do 0,090 mm kristalnu celulozu (tip 1), odvojene sitima različitih veličina (0,037 – 0,149 mm) i pamučna vlakna (eng. cotton linters, Slika 6), prosječne veličine čestica 0,017 – 0,032 mm. Nasuprot tome, mljevenje pamučnih vlakana u kugličnom mlinu (15 min) poboljšalo je njihovu razgradivost, a mljevenjem kompresijom modelnih celuloznih supstrata (apsorpcijski pamuk) brzina hidrolize se povećala proporcionalno broju ponavljanja mljevenja. Pošto je mljevenje kugličnim mlinom poboljšalo razgradivost kristalnih komponenata, a mljevenje kompresijom dovelo je do smanjenja kristalčnosti (CI) i povećanja pristupačnosti površine celuloznog uzorka (vodi ili jodu) veličina čestica nije imala izravan utjecaj ni u jednom slučaju (Vidal i sur., 2011).



Slika 6. Pamučna vlakna (eng. cotton linters) (Anonymous 1, 2017).

Ova istraživanja provedena su na čistoj celulozi, a ne na lignocelulozi, čije strukturne komponente (lignin i hemiceluloza) i njihova organizacija imaju važnu ulogu. Kugličnim mljevenjem drva topole smanjila se kristaličnost i porasla je razgradljivost pri enzimskoj hidrolizi. Važno je napomenuti da su uzorci bili mljeveni i do 8 dana kako bi se uočilo poboljšanje razgradivosti. Pokazalo se da su kuglično mljevenje do 24 h ne dovodi do promjene kristaličnosti, a maksimalna pretvorba koja se postigne enzimskom hidrolizom povećava se neznatno s duljim vremenom mljevenja, ali je i dalje 4 puta veća u odnosu na uzorke koji nisu podvrgnute mljevenju. U oba slučaja, bez upotrebe kemijskog predtretmana pretvorba celuloze je bila ograničena na manje od 50 %, dok je nasuprot tome uz upotrebu kemijskog predtretmana, kojim je uklonjen lignin i hemiceluloza, pretvorba celuloze je iznosila >80 % (Vidal i sur., 2011). Rivers i Emert (1987, 1988, 1988) proučavali su utjecaj mehaničke obrade različitih lignoceluloznih materijala i to obrade koja se izričito odnosi na usitnjavanje čestica. Hidroliza kartona, prosječne veličine čestica 0,099 - 0,406 mm, i novinskog papira, prosječne veličine čestica 0,097 – 0,356 mm, (podvrgnutih suhom i vlažnom mljevenju trenjem) nije dala iskorištenje pretvorbe koje je u korelaciji s veličinom čestica. Na sličan način, konverzija bagase (otpada dobivenog prilikom prerade šećerne trske, Slika 7) ne može se povezati s prosječnom veličinom čestica, iako je sadržavala veći udio finijih čestica (čestice koje prolaze kroz otvore veličine 0,053 mm); a konverzija rižine slame, podvrgnute istom postupku mljevenja, nje pokazivala povezanost ni s veličinom čestica ni udjelom finijih čestica. Suhim mljevenjem velikog broja različitih lignoceluloznih materijala dobivaju se čestice manje prosječne veličine i viši udio finijih čestica (do 10 puta), no ta razlika nije dovela do povećanja konverzije glukoze u etanol. Ovo ukazuje na važnost ukupne dostupne površine, ali i da ovisno o usitnjenom materijalu

veličina čestica može, a i ne mora direktno utjecati na dostupnost površine (autori su naveli porast enzimске hidrolize kod pročišćene i modificirane celuloze, ali ne kod nativne sirovine).



Slika 7. Bagasa (Anonymous 2, 2017).

Suprotno tome, druga istraživanja dokazala su da usitnjavanje čestica ima pozitivan utjecaj na konverziju celuloze. Ostaci prilikom odvajanja pamuka (eng. cotton gin trash, Slika 8) pokazivali su višu razgradnju suhog materijala *in vitro* kada se koristio rezni mlin i otvorima veličine 0,5, 1,0, i 2,0 mm. Brašna uljarica (eng. oilseed meals) suncokreta i palminih koštica pokazala su povećanje konverzije celuloze za ≈ 100 % nakon promjene otvora izlaznog sita sa < 0,5 mm (otvor sita) na veličinu od 0,02 do 0,20 mm (Vidal i sur., 2011).



Slika 8. Ostaci prilikom odvajanja pamuka (eng. cotton gin trash) (Anonymous 3, 2017).

Nakon prosijavanja vrlo sitne piljevine crvenog hrasta kako bi se dobile četiri frakcije različite veličine i 72 h hidrolize 10 % i 13 % kašastih suspenzija, pokazalo se da se kod frakcija najmanje veličine (0,0033 – 0,075 mm) dobiva 50 % i 55 % više glukoze u odnosu na frakciju najveće veličine (0,590 – 0,075 mm). Kukuruzovina ošćerena pomoću bakterijske celuloze pokazala je veću konverziju prilikom finijeg mljevenja, a konverzija je iznosila 45 % za čestice veličine 0,152 i 0,075 mm (100 i 200 mesh), dok je bila nešto veća od 35 % za čestice veličine 2,0 i 1,68 mm (8 i 10 mesh). Nakon mljevenje čipsa smreke mlinom s diskovima i mlinom čekićarom i 72 h enzimске hidrolize zabilježeno je povećanje konverzije celuloze. Povećanje je bilo strogo ovisno o volumetrijskoj površini te se stopa konverzije povećavala sa 2 % na 20 % povećanjem reda veličine površine. Drobļeno meko drvo, uglavnom Kraft pulpa duglazije (eng. Kraft pulped Douglas fir) nakon 72 h hidrolize pokazuje povezanost veličine čestica s konverzijom, pri čemu finije čestice sa udjelom finijih čestica od 20 % (čestica koje prolaze kroz otvore od 0,15 mm) postižu konverzaciju od 90 %, dok grube frakcije (čestice zadržane na 1,20 mm situ) postižu konverziju od 70 %. Razlika u brzini konverzije, pogotovo tijekom početne hidrolize, rezultat je razlike udjela finijih čestica koje bolje adsorbiraju enzime i brže se hidroliziraju. Potvrđeno je da se finije čestice u izbjeljenoj Kraft pulpi mekog drva prve potroše tijekom enzimске hidrolize. Mogući razlog je veći volumen pora u finijim česticama, što je bilo potvrđeno demonstracijom linearne povezanosti postotka finoće i volumena pora (Vidal i sur., 2011).

Uz nekoliko iznimaka, brojna istraživanja pokazala su da veličina čestica utječe na konverziju lignoceluloze tako što manje čestice postižu veću konverziju, što je prikazano u Tablici 3. Rivers i Emert (1987,1988,1988), čiji rezultati nisu pokazali definitivnu povezanost, uveli su dodatni čimbenik koristeći različite procese za usitnjavanje uzoraka. Primjerice, iako mokro mljevenje trenjem nije usitnilo čestice poput suhog mljevenja, došlo je do pojave bubrenja vlakna. Ova pojava je imala učinak sličan mehaničkom usinjavanju pulpe, koji je povećao dostupnost enzimu bez promjene veličine vlakna. Iako su pokazali da suho mljevenje trenjem dovodi do povećanja finoće, ono nije imalo utjecaja na povećanje prinosa konverzije. Ovakvi rezultati odudaraju od onih dobivenih s Kraft pulpom mekog drveta, vjerojatno jer je iz nje već uklonjen dio lignina, zbog čega ima veću konverziju (< 70 % čak i za najgrublje čestice). Uklanjanje lignina zasjenjuje utjecaj veličine čestica, kako se vidi usporedbom delignizirane pulpe mekog drva i neobrađenim uzorcima ili uzorcima obrađenim za bubrenje vlakna. Uklanjanjem lignina, konverzija celuloze raste proporcionalno udjelu finijih čestica. Iako

je dokazan značajan utjecaj veličine čestica na konverziju lignoceluloze, bez kemijskih predtretmana, kojima bi se mijenjao udio lignina i hemiceluloze, brzine konverzije su ograničene na < 50 %, dok se kemijskom modifikacijom postiže konverzija i do > 70 % neovisno o utjecaju veličine čestica. Na temelju toga može se zaključiti da (Vidal i sur., 2011):

1. Mehanička predobrada sama po sebi nije dovoljna da se postignu realno primjenjivi prinosi konverzije lignoceluloze, i
2. Efekt veličine čestica na konverziju u etanol ne može se procijeniti neovisno o obaveznom termokemijskom predtretmanu

Tablica 3. Utjecaj smanjenja dimenzija čestica na enzimsku konverziju različitih lignoceluloznih materijala (Vidal i sur., 2011).

| | Materijal | Raspon veličine čestica ^a | Utjecaj usitnjavanja na konverziju |
|---------------------|--|---|--|
| Pročišćena celuloza | Kristalična celuloza | 0,038 i 0,090 mm (prosjeak) | nema razlike |
| | | 0,037 - 0,149 mm (otvor) | nema razlike |
| | Pamučni otpaci | 0,017 - 0,032 mm (prosjeak) | nema razlike |
| | | kuglično mljevenje | 50 % povećanje razgradivosti (smanjenje težine organskog materijala) |
| | Pamučna i kristalna celuloza | mlin s valjcima | preko 5 puta povećanje početne stope (smanjenje proizvodnje šećera) |
| Lignoceluloza | Drvo topole (lat. <i>Liriodendron tulipifera</i>) | kuglično mljevenje | 8 puta povećanje prinosa šećera (glukoza i ksiloza) (72 r) |
| | Kraft pulpa duglazije (lat. <i>Pseudotsuga menziesii</i>) | < 0,150 mm (20% w/w) do > 1,20 mm (otvor) | 30 % porast prinosa glukoze (72 h) |
| | Drvo smreke (lat. <i>Picea</i>) | < 0,127 do > 1,814 mm (otvor) | 1,5 puta povećanje prinosa glukoze (72 h) |
| | Piljevina crvenog hrasta (lat. <i>Quercus rubra</i>) | 0,033 - 0,850 mm (otvor) | 50 % povećanje prinosa |
| | Pšenična slama | kuglično mljevenje | 4 puta povećanje smanjenja prinosa šećera (8 h) |
| | Bagasa | 0,224 - 0,443 mm (prosjeak) | nema razlike ^b |
| | Rižina slama | 0,107 - 0,465 mm (prosjeak) | nema razlike |
| | Karton | 0,099 - 0,406 mm (prosjeak) | nema razlike |
| | Novinski papir | 0,097 - 0,356 mm (prosjeak) | nema razlike |
| | Kukuruzovina | 0,075 - 0,152 mm, 1,68 - 2,0 mm (otvor) | 15 % povećanje prinosa glukoze (24 h) |
| | Ostaci odvajanja pamuka (eng. Cotton gin trash) | 0,5 - 2,0 mm (otvor) | 40 % povećanje razgradljivosti u probavi preživača (IVDMD ^c) |
| | Brašno uljarica | kriogeni mlin | 2 puta povećanje neutralnog prinosa šećera (72 h) |

^a Frakcije veličina čestica su označene kao „otvor“ (veličina otvora sita koje zadržava frakciju čestica) ili „prosjeak“ (prosječna veličina čestica). U slučaju kada veličina nije navedena ili je navedena u obliku kojega je teško prikazati u tablici, naveden je način usitnjavanja.

^b Sedmostruko povećanje finoće (postotak w/w koji prolazi kroz sito čiji su otvori veličine 53 µm) daje 7 puta veći prinos glukoze (48 h).

^c *In vitro* razgradivost suhe tvari (eng. in vitro dry matter digestibility, IVDMD) - *in vitro* metoda za mjerenje razgradivosti u probavi preživača.

2.5. Utjecaj veličine čestica na termokemijsku predobradu biomase

Kako bi se postigla ekonomičnost konverzije lignoceluloze, neophodan korak je termokemijska predobrada kojom se osigurava učinkovita enzimaska hidroliza. Zato je prilikom određivanja željene veličine čestica sirovine za konverziju lignoceluloze nužno poznavati utjecaje veličine čestica na procese termokemijske predobrade. Brojni procesi predobrade pokazali su slične ishode i ekonomske rezultate, no nedostaje sustavna procjena utjecaja različitih karakteristike sirovina na različite tehnologije predobrade. Istraživanja utjecaja veličine čestica uglavnom se temelje na jednoj metodi predobrade, a procjene učinkovitosti predobrade se razlikuju od istraživača do istraživača. Najbliže takvoj sustavnoj procjeni je istraživanje koje proučava utjecaj kombiniranja različitih fizikalnih metoda predobrade (kako bi se povećala specifična površina) i različitih kemijskih metoda predobrade na razgradljivost pšenične slame. Analiza njihovih rezultata, u smislu relativnog stupnja hidrolize (nakon 8 h) i promjene udjela lignina u sirovini, pokazala je da niti jedna od mehaničkih metoda predobrade ne povećava stupanj hidrolize u usporedbi sa stupnjem hidrolize postignutom samo kemijskom obradom. Niti utjecaj mljevenja (uz naknadnu kemijsku obradu) na uklanjanje lignina nije bio dosljedan; mljevenje je poboljšalo uklanjanje lignina pri obradi perocetnom kiselinom, a smanjilo pri obradi sa natrijevim hidroksidom (Vidal i sur., 2011).

Vodeći procesi predobrade lignoceluloze su (Vidal i sur., 2011):

1. Predobrada razrijeđenom kiselinom (eng. dilute acid pretreatment)
2. Parna eksplozija (eng. steam explosion)
3. Eksplozija u tekućem amonijaku (eng. ammonia fiber explosion, AFEX)
4. Predobrada vrućom vodom (eng. liquid hot water, LHW)
5. Obrada vapnom (eng. lime treatment)

U narednim poglavljima biti će posvećena pažnja utjecaja veličine čestica na predobradu. Pritom će se posebno govoriti o predobradi razrijeđenom kiselinom i parnoj eksploziji budući da se one najviše proučavaju.

2.5.1. Predobrada razrijeđenom kiselinom

Ovo je jedna od razvijenijih metoda predobrade, koja već ima komercijalnu upotrebu, npr. u proizvodnje furfurala. Proučavana je primjena različitih kiselina, iako se najčešće koristi sumporna kiselina. Obrada obuhvaća miješanje biomase i razrijeđene kiseline ($\leq 2\%$, obično od $0,5\%$ do 1% w/w) i zagrijavanje smjese do temperature od 160 do $220\text{ }^\circ\text{C}$. Glavni cilj takvog procesa je cijepanje hemiceluloze na oligomere i monomere (tj. ksiloze). (Vidal i sur., 2011).

Kim i Lee, (2002) upotrijebili su difuzijski model kako bi ispitali difuzivnost sumporne kiseline u različitim biomasama i dokazali su da difuzija unutar čestica može imati važnu ulogu ovisno o trajanju predobrade (tj. vremenu potrebnom za potpunu hidrolizu hemiceluloze). Njihovo istraživanje je pokazalo da je kiselini bilo potrebno tri puta više vremena kako bi postigla prodiranje od 70% za nasumično narezanu biomasu (1 do 2 cm) u odnosu na praškaste uzorke ($0,853$ do $1,20\text{ mm}$). Predložili su da se kritična veličina čestica (veličina čestica iznad koje difuzija postaje važna za proces predobrade) odredi iz sljedeće jednadžbe:

$$\text{kritični promjer} = (D_e/k)^{0,5}$$

gdje je:

D_e – difuzivnost

k – konstanta kinetike brzine procesa predobrade

Ova jednadžba ne odnosi se izričito na strukturu ili kompoziciju celuloznog materijala, iako je volumen pora vjerojatno ovisan o takvim faktorima kao sastavu lignina i fizikalne promjene (osim usitnjavanja) mogu biti rezultat mljevenja. Udio vlage nije se pokazao kao važan faktor jer prethodno namakanje nije imalo utjecaja na procjenu konstante difuzije.

Kritična veličina čestica izračunata je prema ovom modelu za četiri vrste biomasa (ukrasno proso, slama, kukuruzovina i drvo), koristeći D_e vrijednosti iz istraživanja Kim i Lee (2002), a vrijednosti za k uzete su iz istraživanja: Carrasco i Roy, 1992, Maloney 1986 (citirano u Vidal i sur., 2011). Dobivena kritična vrijednost iznosila je od $1,0$ do $3,2\text{ mm}$ za promjer čestice sferne geometrije i od $0,3$ do $1,1\text{ mm}$ debljine za čestice pločaste geometrije.

Kritična veličina čestica kod predobrade različitih sirovina razrijeđenom kiselinom izračunata je prema modelu kojeg su predložili Kim i Lee (2002). Maseni udio sulfatne kiseline iznosila je $0,5\%$ w/w, a temperatura $180\text{ }^\circ\text{C}$. Kritična debljina i promjer odnose se na čestice

pločastog, odnosno sfernog oblika. Vrijednosti k dobivene su korištenjem Arrheniusovog izraza za razgradnju hemiceluloze (aproksimacija za jednu frakciju hemiceluloze), s parametrima iz literature

$$k = A_0 c^n e^{-\frac{E}{RT}}$$

gdje je:

A_0 - preeksponencijalni faktor ($c = 0$)

c – maseni udio kiseline (w/w)

n - eksperimentalno određen parametar

E - energija aktivacije

R - plinska konstanta ($R = 8.314\text{ J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$)

T – temperatura

Tablica 4. Kritične veličine pri preobradi nekih linoceluloznih sirovina razrijeđenom kiselinom (Vidal i sur., 2011).

| Sirovina | Kritična veličina | | | | |
|------------------------|---|---------------------------------|-----------------------|------------------|-----------------|
| | De [$10^{-5}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$] | k [10^{-2}s^{-1}] | (De/k) ^{0,5} | Debljina [mm] | Promjer [mm] |
| Kukuruzovina | 2,27 | 0,80 | 0,53 | 1,06 | 3,19 |
| Bagasa | 1,48 | 5,83 | 0,16 | 0,32 | 0,96 |
| Tvrdo drvo | 1,24 | 1,69 | 0,27 | 0,54 | 1,63 |
| Rižina/ pšenična slama | 9,49 | 7,10 | 0,37 | 0,73 | 2,19 |

Eksperimentalna istraživanja pokazala su nešto veće kritične vrijednosti od onih izračunatih. Nije uočeno da veličina čestica bigase manja od $0,5\text{ mm}$ ima utjecaj na smanjenje prinosa šećera. Pokazalo se da pri višim omjerima tekuće faze u odnosu na drvo, biomasa tvrdog drva jednako reagira na obradu, neovisno da li je debljina bila $0,38$ ili $2,54\text{ mm}$. No, pri manjem udjelu tekuće faze u odnosu na drvo, došlo je do nedovoljne impregnacije pri debljini od $2,54\text{ mm}$. Uočeno je da različite drvne sirovine pokazuju usporedivo oslobađanje ksiloze i kinetiku razgradnje bilo da su pripremljene na otvorima $> 0,599\text{ mm}$ ili kao čestice veličine od $0,853$ do $1,68\text{ mm}$. Pri radu sa poluindustrijskim reaktorom pokazano je da se razgradivost ukrasnog prosa poveća sa 60% na 80% kada se veličina čestica smanji sa 10 na 3 mm . Međutim, u eksperimentu u kojem su homogenizirali predobrađene materijale različitih veličina

čestica koristeći laboratorijski mikser i zatim ih hidrolizirali, nije uočena razlika u enzimskoj razgradivosti. Ovo bi moglo značiti da razlika u veličini čestica ima više utjecaja na enzimsku hidrolizu nego na predobradu kiselinom (Vidal i sur., 2011).

2.5.2. Parna eksplozija

Parna eksplozija je relativno razvijena tehnologija koja se primjenjuje pri pripremi pulpe drveta, kao u Masonite procesu (Vidal i sur., 2011). Masonite proces je proces proizvodnje ploča iverica (eng. hardboard) kod kojeg se čips drva usitnjava tako što se podvrgne visokom tlaku te zatim naglom padu tlaka, nakon čega se ploče pritišću i griju čime se dobiva konačni proizvod (Anonymous 5, 2016). Biomasa se podvrgava zasićenoj pari pod visokim tlakom tijekom određenog vremena, nakon čega se tlak naglo smanjuje, zbog čega materijali prolaze eksplozivnu dekompresiju. Visoke temperature uzrokuju razgradnju hemiceluloze i transformaciju lignina što povećava mogućnost hidrolize celuloze. Parna eksplozija se obično provodi nekoliko sekundi ili minuta pri 160 - 260 °C i 0.69 - 4.83 MPa, nakon čega se tlak smanjuje na atmosferski (Kumar i sur., 2009).

Istraživanja su pokazala da su veće čestice pogodnije za predobradu parnom eksplozijom. Meko drvo (duglazija), mljeveno do tri različite veličine čestica (otvori < 0,422 mm, 1,5 × 1,5 cm i 5 × 5 cm), prethodno je obrađeno parnom eksplozijom, kataliziranom sa SO₂, te je uočeno da su veće čestice bolje podnosile težinu predobrade (tj. imaju veći sadržaj otopljenih ugljikohidrata i manje furana kao produkta razgradnje) te su dale najviše oslobođene celuloze. Suprotno tome, manje čestice dale su više otopljene hemiceluloze i lignina. Nakon naknadne prerade, kako bi se čestice još više usitnile mljevenjem pločama (razmak od 0,178 mm), prvotno veće čestice pokazale su bolje uklanjanje lignina ispiranjem peroksidom i veći opseg enzimске hidrolize, kojeg su istraživači pripisali manjem stupnju ponovnog taloženja lignina što je rezultat intenzivna uvjeta obrade (Vidal i sur., 2011).

Slične rezultate pokazala je i parna eksplozija bora (također meko drvo), kod koje je frakcija s najvećim česticama (8 do 12 mm) pokazala bolje oslobađanje celuloze i bolje otapanje hemiceluloze. Konverzija celuloze u glukozu bila je tek nešto veća kod frakcija većih čestica u odnosu na frakcije manjih čestica. Međutim, ukupna oslobođena glukoza (koja uključuje i glukozu otopljenu tijekom parne eksplozije) bila je značajno veća kada su se koristile veće čestice (Vidal i sur., 2011).

Enzimska hidroliza ostataka biljke *Brassica carinata* (hrv. etiopijska gorušica) (Slika 9), koja spada u zeljaste biljke, bila je uspješnija kod manjih čestica iako je oslobođena celuloza bila viša kod većih frakcija. Sirovi materijal je meljen na čestice različitih veličina (2 - 5 mm, 5 - 8 mm i 8 - 12 mm) te podvrgnut parnoj eksploziji pri različitim uvjetima (4 min pri 190°C i 8 min pri 210°C). Kod čestica veličine 2 - 5 mm oslobođena celuloza je iznosila je 84 % pri 190°C i 4 min i 57 % pri 210°C i 8 min. Suprotno tome kod većih čestica oslobođeno je više celuloze, 99 % pri 190°C i 4 min i 88 % pri 210 °C i 8 min. Enzimska hidroliza bila je uspješnija kod manjih čestica (100 % za frakcije 5 - 8 mm i 2 - 5 mm, a 85 % za frakciju 8 - 12 mm). Ovo upućuje na to da kondenzacija lignina koja je ključan faktor za meko drvo, nema utjecaj na zeljaste sirovine. Dakle, veće čestice omogućile su veći maksimalni prinos glukoze (> 80 %, u odnosu na manje čestice s prinosom od ≤70 %) (Ballesteros i sur., 2002).



Slika 9. *Brassica carinata* (Anonymous 4, 2017).

Parna eksplozija tvrdog drva (topole) nije pokazala razlike ni kod enzimске razgradivosti ni kod prinosa etanola pri istovremenoj saharifikaciji i fermentaciji (eng. simultaneous saccharification and fermentation, SSF) između frakcija različitih veličina (2 - 5 mm i 12 - 15 mm) što upućuje na to da je snažan utjecaj veličine čestica (tj. da manje čestice poboljšavaju kondenzaciju lignina i kasniji otpor enzimskoj hidrolizi) bio više presudan kod mekog drva (Vidal i sur., 2011).

2.5.3. Druge metode predobrade

Predobrada vrućom vodom (eng. liquid hot water, LHW) je jedna od hidrotermalnih metoda predobrade lignoceluloznih materijala koje se primjenjuju već nekoliko desetljeća, npr. u industriji pulpe. Voda pod visokim tlakom može prodrijeti u biomasu, hidratirati celulozu i ukloniti hemicelulozu te dio lignina. Glavna prednost tog postupka provođenje bez dodatka kemikalija, pa izgradnja reaktora ne zahtjeva materijale otporne na koroziju (Taherzadeh i Karimi, 2008). Tvrdo drvo (topola), različitog raspona veličina (2 do 5 mm i 12 do 15 mm), podvrgnuto je LHW predobradi te nije uočena razlika u njihovoj enzimskoj razgradnji niti prinosu etanola kod SSF. Slično tome, daljnje usitnjavanje čipsa jasike (početne veličine > 3 mm) i bagase (početne veličine < 1,4 mm) nije rezultiralo većom konverzijom celuloze ni većim prinosom etanola, nakon LHW predobrade (Vidal i sur., 2011).

Eksplorzija u tekućem amonijaku (eng. ammonia fiber/freeze explosion, AFEX) je predobrada kojoj se lignocelulozna biomasa podvrgava tekućem amonijaku pri visokoj temperaturi i tlaku određeno vrijeme, nakon čega se tlak naglo smanjuje. Sam proces je vrlo sličan parnoj eksploziji. U standardnom procesu koristi se 1 – 2 kg amonijaka po kg suhe tvari biomase, pri temperaturi 90 °C i vremenu zadržavanja 30 min (Kumar i sur., 2009). Pokazalo se da mljevenje biomase kukuruzovine prije AFEX predobrade, s polazne veličine 0,5 do 0,85 mm na veličinu < 0,15 mm, dovodi do porasta konverzije glukana tijekom 72 h za 10 % - 15 %, u odnosu na mljevenja nakon predobrade, samo u slučaju kada je predobrađena kukuruzovina oprana prije hidrolize. Pranjem nakon AFEX predobrade uklanjaju se inhibitori (moguće je da su to produkti razgradnje lignina), a pranje je efikasnije kad na predobradu idu manje čestice. Nadalje se pokazalo da samo mljevenje dovodi do veće konverzije glukana i ksilana za 15 % - 20 % kod neobrađene kukuruzovine, ali nije se kvantificiralo potencijalno povećanje koje bi se dobilo mljevenjem kukuruzovine nakon AFEX obrade. AFEX predobrada vlakna kukuruza (dobivenih mokrim mljevenjem zrna kukuruza) nije pokazala razliku u oslobođenoj glukozu ili reducirajućim šećerima, među nemljevenim vlaknima i vlaknima podvrgnutim mljevenjem u Wiley mlinu sa sitima od 0,422 mm, vjerojatno zbog zanemarivog udjela lignina u vlaknima kukuruza, (Vidal i sur., 2011).

Obrada vapnom (eng. lime treatment) uključuje dovođenje u kontakt vapnene vode (eng. lime water) i biomase pri relativno blagim temperaturama (od temperature okoline do 100 °C), tijekom duže vremena (nekoliko sati ili dana) ili pri višim temperaturama kraće vrijeme. Pokazalo se da među pet frakcijama ukrasnog prosa različitih veličina (mesh brojevi 4 - 10, 10 -

20, 20 - 40, 40 - 80 i >80) sve frakcije koje prolaze kroz 20 mesh (<0,853 mm) ne pokazuju povećanja prinosa glukoze 3 dana nakon hidrolize. Slično tome za kemijsku predobradu koristila se i razrijeđena lužina. U istraživanju enzimske hidrolize kukuruzovine prethodno obrađene razrijeđenim NaOH (0,1-1,0 M), samljevenu do tri različite veličine (čestice koje prolaze kroz otvore od 2,0, 0,707 i 0,25 mm), utvrđeno je da mljevenje čestica na veličinu manju od 2 mm ne donosi korist (Vidal i sur., 2011).

Rezultati ovih istraživanja učinkovitosti predobrade kao funkcije veličine čestica sažeti su u Tablici 4. Maksimalna veličina čestica, definirana kao veličina ispod koje nije uočeno daljnje povećanje učinkovitosti predobrade (što je procijenjeno prema dobivenim prinosima konverzije), varirala je od niskih < 0,15 mm do viših vrijednosti od 50 mm. Parna eksplozija pokazala je veće vrijednosti maksimalne veličine čestica (> 10 mm), predobrada razrijeđenom kiselinom i lužinom (AFEX, obrada vapnom i obrada razrijeđenom lužinom) pokazivale su manje vrijednosti maksimalne veličine čestica (< 3 mm), a za LHW predobradu maksimalna veličina čestica bila je srednja vrijednost gore navedenih predobrada.

2.6. Predobrada lignoceluloznih sirovina dostupnih u republici Hrvatskoj

Buljubašić (2012) je dala prikaz lignoceluloznih sirovina dostupnih u Republici Hrvatskoj. Radi se uglavnom o kukuruzovini, kukuruznim oklascima, kukuruznoj komušini, pšeničnoj i ječmenoj slami, lisnim rozetama šećerne repe, ostacima rezidbe maslinika i voćnjaka te bukovoj piljevini. Među navedenim sirovinama najznačajnije su kukuruzovina, kukuruzni oklasci i pšenična slama.

Da bi se razvila ekonomski isplativa biotehnoška proizvodnja utemeljena na navedenim sirovinama, izuzetno je važno primijeniti odgovarajuću metodu predobrade. Najbolja metoda i uvjeti predobrade uvelike ovise o vrsti lignocelulozne sirovine (Taherzadeh i Karimi, 2008), a također i o karakteristikama biotehnoškog procesa koji se namjerava provesti, kao i o krajnjem proizvodu. Primjeri alkalne predobrade kukuruzovine, kukuruznih oklasaka i pšenične slame prikazani su u Tablicama 5, 6 i 7, koje sadrže dimenzije sirovina, dodane kemikalije, parametre predobrade i njihove učinke.

Tablica 4. Maksimalne veličine čestica ili veličine biomase ispod kojih nije uočeno daljnje povećanje učinkovitosti predobrade u raznim istraživanjima (Vidal i sur., 2011).

| Predobrada | Sirovina | Mjera učinkovitosti | Maksimalna veličina čestica ^a |
|----------------------|--|--|--|
| Razrijeđena kiselina | Ukrasno proso (lat. <i>Panicum virgatum</i>) | Enzimaska hidroliza | < 3 mm |
| | Različita drva i ukrasno proso | Proizvodnja i razgradnja ksiloze | 1,68 do 0,853 mm |
| | Tvrdo drvo | Enzimaska hidroliza | 2,54 mm (debljina čipsa) |
| AFEX | Kukuruzovina | Enzimaska hidroliza | < 0,15 mm |
| | Kukuruzna vlakna | Enzimaska hidroliza | nemljevene vlakna |
| Tekuća topla voda | Bagasa | Enzimaska hidroliza i SSF ^b | < 1,4 mm |
| | Jasika (lat. <i>Populus tremula</i>), tvrdo drvo | Enzimaska hidroliza i SSF ^b | > 3 mm |
| | Topola (lat. <i>Liriodendron tulipifera</i>), tvrdo drvo | Enzimaska hidroliza i SSF ^b | 12 do 15 mm |
| Parna eksplozija | Douglas jela (lat. <i>Pseudotsuga menziesii</i>), meko drvo | Enzimaska hidroliza | 50 mm (debljina čipsa) |
| | <i>Brassica carinata</i> (ostatak biljke) | Ukupni prinos glukoze | 8 do 12 mm |
| | Bor (lat. <i>Pinus</i>), meko drvo Topola, tvrdo drvo | Enzimaska hidroliza i SSF ^b | 12 do 15 mm |
| Obrada vapnom lužina | Ukrasno proso (lat. <i>Panicum virgatum</i>) | Prinos glukoze (3 dana hidrolize) | < 0,853 mm |
| | Kukuruzovina | Enzimaska hidroliza | 2,0 mm |

^a Veličine su vrijednosti otvora sita korištena za prosijavanje frakcija biomase, osim ako je navedena debljina čipsa

^b SSF simultana saharifikacija i fermentacija

Tablica 5. Primjeri i učinci alkalne predobrade kukuruznih oklasaka.

| Dimenzije i % s.tv. sirovina | Kemikalija (konc.) | Omjer kemikalija / sirovina, omjer kruto / tekuće | Vrsta i parametri obrade | Učinak procesa predobrade | Korištenje nakon predobrade | Napomena | Referenca |
|--|--------------------|--|---|--|--|---|-----------------------|
| 20 mesh, sastav: celuloza 36,4 %, hemiceluloza 34,9 %, i lignin 14,8 %. | NaOH, 1 % | 1:6 (omjer kruto / tekuće) | 30-50°C / 4h 30-50°C / 12h Optimalno: 1% NaOH / 50°C / 4 h | Nakon predobrade: celuloza 50,4 %, hemiceluloza 31,7 % i lignin 7,4%. Alkalna predobrada djeluje na strukturu u celuloze te dovodi do povećane enzimске hidrolize (78 %, 90 % i 100 %). | Enzimaska hidroliza celulozom (<i>Penicillium pinophilum</i>), Accellerase™ 1,000, Palkofeel-30, Palkocel-40. | - | Sahare i sur., (2012) |
| < 1 mm i sirovina podvrgnuti neizotermalnoj obradi s vodom (autohidroliza) | NaOH (0,2-2,0 N) | 0,028 - 0,168 g/g (omjer kruto/ tekuće). Pri 0,168 g/g dobivena je previše viskozna smjesa. | Optimalni uvjeti hidrolize 0,5N NaOH, 0,084 g/g (omjer kruto/tekuće), sobna temperatura / 6 h | Obradom s 2N NaOH / 24 h u hidrolizatu nisu detektrani monosaharidi. Prisutni su oligosaharidi max. 24 g/L (ksilooligosaharidi, arabinooligosaharidi, glukooligosaharidi). | - | Usmjereno je na topljivost ferulinske kiseline (FA) i srodnih spojeva. | Torre i sur., (2008) |
| Mljeveni kukuruzni oklasci (dimenzije nisu navedene) | NaOH, 3% (w/v) | Alkalna obrada: 3g biomase + 300 ml otopljene lužine, | Obradeno u autoklavu na 121°C, 30 min, neutralizirani ostatak ručno procijeđen. | Nakon alkalne predobrade: celuloza 73 %, hemiceluloza 17% i lignin 8%. | Enzimaska hidroliza Prinos reducirajućih šećera za alkalnu predobradu iznosio je 78 %. | Alkalna predobrada dovodi bubrenja i smanjenje kristalčnosti, povećanje unutarnje površine, narušavanja strukture lignina i pucaanje strukturnih veza između lignina i ugljikohidrata . | Singh i sur., (2013) |

Tablica 5. (nastavak)

| Dimenzije i % s.tv. sirovina | Lužina (spoj i konc.) | Omjer lužina / sirovina, omjer kruto / tekuće | Parametri obrade | Učinak procesa predobrade, učina hidrolize | Naknadna enzimaska hidroliza (ili nešto drugo) | Napomena | Referenca |
|------------------------------|------------------------------|--|--|--|---|--|---------------------------|
| < 2 mm | NaOH, 2 wt.-% | 100 g uzorka + otopina reagensa (omjer tekuće/kruto oko 7) | Uljna kupelj (110 °C / 1 h, uz miješanje), oprano do neutralnog, a tekućina odvojena na staklenom filtru. | Prije predobrade: 35% celuloze, 38% hemiceluloze i 10% lignina. Nakon alkalne predobrade: 71% celuloze, 15% hemiceluloze i 6% lignina | Enzimaska hidroliza (celulaza NS50013, glukokozidaza NS500110) | Usporedbom alkalne i kiselinske predobrade zaključeno je da je alkalna bolja zbog bolje delignifikacije i digestibilnosti. | Joelovich i Morag, (2012) |
| < 5 mm | NaOH, 1,0, 1,5 i 2,0 % (w/w) | | 90 °C / 90 h | Mali pad udjela celuloze, 50% smanjen udio lignina, i skoro 50% smanjen udio hemiceluloze | Proizvodnja enzima fermentacijom na čvrstim supstratima: <i>Trichoderma koenigi</i> + kruti ostatak nakon alkaline obrade | Pad udjela hemiceluloze u biomasi nakon predobrade je visok gubitak za okslasku. Povećali su proizvodnju ksilanaze. | Bandkari i sur., (2014) |
| < 2 mm | NaOH, 0,5 mol/L | Biomasa (20 g) + 160 mL vodene otopine NaOH (dodano 160 g kg ⁻¹) | Autoklav (121°C / 30 min); prije enzimске hidrolize pranje do pH 7 (vodovodna voda, 100 mL g ⁻¹) filtrirana kroz tkaninu od najlona, osušena u pećnici (80 °C / 48 h), pohranjena u zatvorene plastične vrećice na 4 °C do enzimске hidrolize. | Vrlo malo glukoze i ksiloze (oko 1 g/L) u tekućoj fazi → uklonjen lignin uz minimalni gubitak šećera. | Enzimaska obrada (Cellic CTec2 unutar 24 h) - nema inhibicije enzima kad je oprano nakon alkalne predobrade. Nakon 72 h prinos šećera iznosi 932 g/kg . | Aceton butanol etanol (ABE) fermentacija - <i>Clostridium saccharobutylicum</i> | Gao i sur., (2014) |

Tablica 5. (nastavak)

| Dimenzije i % s.tv. sirovina | Kemikalija (konc.) | Omjer kemikalija / sirovina, omjer kruto / tekuće | Vrsta i parametri obrade | Učinak procesa predobrade | Korištenje nakon predobrade | Napomena | Referenca |
|---|--|---|--|---|--|--|--------------------|
| 40 mesh (nasjeckani čips) | NaOH, 3% (w/v) | - | Sobna temperatura /24 h | Kombinacija mijevanja kuglicama i vodenog bubrenja (eng. Combined ball milling- aqueous swelling, CBMAS) dovodi do ubrzanja hidrolize kukuruznih okslaska. Poveća se udio amorfne celuloze, zbog čega se povećala digestibilnost samijevene celuloze. | Enzimaska hidroliza (celulaza i ksilanaza) | Vlažno mijevanje stakleni kuglicama je bolje od alkalne i kiselinske predobrade. | Luo i sur., (2013) |
| 800 µm Korišten je supstrat nakon uzgoja gljive bukovače, (lat. <i>Pleurotus ostreatus</i>), koji sadrži okslasku (eng. spent mushroom substrate, SMS). | Obrada pomoću KOH, vapna ili amonijaka: KOH i vapno (0,25, 0,5, 0,75 i 1M); amonijak (1,5, 10 i 115 M) | 10 % (w/v) | 50 - 80 °C, 30 - 120 min. Optimalno: 1 M KOH/80 °C/90 min; 1M vapno/ 80°C/120 min; 10 M amonijak, 70 °C, 120 min | Nakon predobrade oko 5-6 puta bolji rezultati. | Enzimaska obrada: Celulaza (NS50013) i ksilanaza (NS50014) | Proizvodnja biognojiva pomoću <i>Pichia farinose</i> FL7 | Zhu i sur., (2013) |
| 2-3 mm, 7 sirovina (među kojima su kukuruzni okslasci, kukuruzovina i pšenična slama) | NaOH (2 %) kombiniran s raznim drugim kemikalijama (NaClO, NaClO ₂ , HNO ₃) | 10 (omjer tekuće/kruto) | 100 °C / 60 min | Prikazan je primjere rezultata samo za kukuruzovinu, a ostalo daje zbirno tako da se ne vidi koliko je bilo za kukuruzne okslasku. | Celulitički enzim GC-220 i β-glukokozidaza | Lagana alkalna predobrada dopunjena s izbeljivanjem. | Joelovich, (2014) |

Tablica 5. (nastavak)

| Dimenzije i % s.tv. sirovina | Kemikalija (konc.) | Omjer kemikalija / sirovina, omjer kruto / tekuće | Vrsta i parametri obrade | Učinak procesa predobrade | Korištenje nakon predobrade | Napomena | Referenca |
|--|--------------------|---|---|--|---|--|-------------------------|
| < 2 mm (mlin čekićar) | NaOH, 2% (w/v) | 15 g / 200 mL | temperature: 100, 120, 140 i 160 °C, vrijeme zadržavanja: 5, 10, 30 i 60 min. Optimalni uvjeti za predobradu kukuruzne oklaskе i stabljike bili su 140 °C, 30 min, a za lišće 140 °C, 60 min. | Koncentracija glukoze nakon predobrade iznosila je 24,7 g/L za oklaskе, 21,3 g/L za stabljike i 15,0 g/L za lišće. Prinos glukoze iznosio je 81,73% za oklaskе, 81,23% za stabljike i 51,92% za lišće. | Enzimska hidroliza (celulaza iz <i>Trichoderma reesei</i> (ATCC 26921)) i β -glukozidaza | - | Aboagye i sur., (2017) |
| Mljevena biomasa (dimenzije nisu navedene) | NaOH, 1-2 % | - | Kombinirana alkalna i ultrazvučna predobrada: 1% NaOH i ultrazvuk 60 min; 1% NaOH i ultrazvuk 100% duty; 2% NaOH i ultrazvuk 60 min; 2% NaOH i ultrazvuk 100% duty cycle; 1% NaOH u pećnici na 60°C 90 min; i 2% NaOH u pećnici na 60°C 90 min. | Kombinirana alkalna i ultrazvučna predobrada značajno je promijenila kemijske strukture svih uzoraka te je bolja od same alkalne predobrade. Svega od metoda predobrade rezultirala je različitim udjelom celuloze i hemiceluloze. | Enzimska hidroliza, različite koncentracije enzima celulaze (250, 400, 550, 700 CMC U/g biomase) inkubirane na 50 °C, 42 h, na tresilici. | Konc. reducirajućih šećera porasla je za 36,3 % porastom koncentracije enzima. | Waeserat i sur., (2016) |

Tablica 6. Primjeri i učinci alkalne predobrade kukuruzovine

| Dimenzije i % s.tv. sirovina | Kemikalija (konc.) | Omjer kemikalija / sirovina, omjer kruto / tekuće | Vrsta i parametri obrade | Učinak procesa predobrade | Korištenje nakon predobrade | Napomena | Referenca |
|---|---|---|---|--|--|--|----------------------|
| < 3 mm Prije predobrade: 37,0 % celuloze, 26,8 % hemiceluloze i 18,0 % lignina | H ₂ O ₂ , 2% (v/v), nakon pripreme suspenzije biomase podešeno do pH 11,5 dodatkom 10M NaOH | 10% (w/v) | 2% H ₂ O ₂ (v/v), pH 11,5, 35 °C, 24 h, 250 o/min. | Nakon predobrade dobiveno je 557 mg fermentabilnih šećera po g kukuruzovine (79,5% teoretskog prinosa šećera) | Enzimska hidroliza (celulaza, β -glukozidaza, i hemicelulaza) | Proizvodnja etanola (rekombinantna <i>Escherichia coli</i> FBRS): 1. odvojenom hidrolizom i fermentacijom (SHF); 2. istovremenom saharifikacijom i fermentacijom (SSF) | Saha i Cotta, (2014) |
| 25 mesh Sadrži: 21,36% lignina 46,67% celuloze i 19,35% hemiceluloze (w/w) | H ₂ O ₂ , (7,5% v/v) podešeno lužinom na pH 11,5 (nije navedeno koja lužina je korištena) + H ₂ SO ₄ (0,75% v/v) | nije navedeno | Prvo alkalna predobrada (pH 11,5, 35 °C, 6 h), zatim predobrada razrijeđenom kiselinom (55 °C, 6 h) | Nakon alkalne predobrade sadržaj celuloze u kukuruzovini porastao je na 68,79% (w/w), a nakon predobrade razrijeđenom kiselinom na 65,25% (w/w). | Optimalni uvjeti fermentacije: 35 g/L čvrstog materijala nakon predobrade, pH 6,0/ 50°C/35 o/min/ 48 h | <i>Aspergillus oryzae</i> | Fossain, (2013) |
| 6 mm (10% vlage) | NaOH (0,08 g /g) | 0,08 g NaOH/g s.tv. kukuruzovine; 500 g kukuruzovine + 50% otopina NaOH (w/w) + deionizirana voda | Alkalna predobrada reaktivna (tip LABOMAT) pri različitim temperaturama i koncentracijama NaOH. | Očuvano je više od 95% celuloze, a otapanje hemiceluloze i lignina variralo je ovisno o uvjetima predobrade. | Enzimska hidroliza (celulaza s pomoćnim enzimima poput α -arabinofuranozidaze i β -ksilozidaza) | - | Chen i sur., (2013) |

Tablica 6. (nastavak)

| Dimenzije i % s.tv. sirovina | Kemikalija (konc.) | Omjer kemikalija / sirovina, omjer kruto / tekuće | Vrsta i parametri obrade | Učinak procesa predobrade | Korištenje nakon predobrade | Napomena | Referenca |
|---|-----------------------------------|---|--|---|---|---|----------------------|
| 5–10 mm (nasjeckana pomoću rezača za papir i samlijevena mlinom čekićarem) | NaOH (2%, 4% i 6%) | - | Predobrada NaOH u mokrom stanju (eng. wet state) (WS) sodium hydroxide pretreatment). Uvjeti predobrade: 88% vlage, 3 dana, sobna temperatura (20°C). | Udio ukupnog lignina, celuloze i hemiceluloze se smanjio, a povećao se sadržaj ekstrakta tople vode. Došlo je do promjene kemijskih struktura što je dovelo do bolje biorazgradivosti. | Anaerobna razgradnja, (zabilježeno povećanja proizvodnje ukupnog biogoriva i povećanja prinosa metana). | WS NaOH predobrada mogla bi biti isplativa metoda za visoku učinkovitu biološku pretvorbu kukuruzovine u bioenergiju. | Zheng i sur., (2009) |
| 3 mm (reznj mlini) | 4 mL 25% (w/v) NH ₄ OH | - | Mokra oksidacija (eng. wet oxidation) Optimalni uvjeti: 200 °C u autoklavu, 8 min, uz 2 g/L Na ₂ CO ₃ kao katalizator. | Nakon predobrade presalo je 50 % hemiceluloze i 80 % početne eluloze. | Simultana saharifikacija i fermentacija (SSF) Enzimska konverzija celuloze u glukozu porasla je 4 puta kod predobradene kukuruzovine u usporedbi s neobrađenom | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Varga i sur., (2005) |
| 5–10 mm (nasjeckana pomoću rezača za papir i samlijevena u mlinu čekićaru). | 2% NaOH | - | Sobna temperatura (20°C), udio vlage 90 %, 3 dana | Razgradnja hemiceluloze, celuloze i lignina bila je intenzivnija kod dužeg vremena obrade, više temperature i većeg sadržaja vlage, no više temperature i duže vrijeme predobrade mogu dovesti do većeg gubitka suhe tvari. | Anaerobna razgradnja Prinos bioplina iznosio je 420,6 mL/g, a prinos metana 233,0 mL/g. | - | Zheng i sur., (2010) |

32

Tablica 6. (nastavak)

| Dimenzije i % s.tv. sirovina | Kemikalija (konc.) | Omjer kemikalija / sirovina, omjer kruto / tekuće | Vrsta i parametri obrade | Učinak procesa predobrade | Korištenje nakon predobrade | Napomena | Referenca |
|--|---|---|---|--|---|--|------------------------|
| Frakcije između 9 i 35 mesh | Vodena otopina amonijaka, 15 wt% | - | Uvjeti predobrade: 15 wt% amonijaka, 170 °C, 90 min, protok 5 ml/min, 2,3 MPa. | Uklonjeno je 70–85% ukupnog lignin, otopljeno je 40–60% hemiceluloze i zadržano je više od 95% celuloze. | Enzimska hidroliza, uvjeti: 72 h, 60 ili 10 FPU/g glukana pH 4,8, 50 °C, 150 o/min. | Uklanjanjem lignina i hemiceluloze povećala se enzimska razgradivost. | Kim i sur., (2003) |
| < 0.5 mm (Wiley mlin) sadrži : 34,4% (w/w) glukoze i 22,4% (w/w) ksiloze | H ₂ O; podešen do pH 11.5 opmoću 5 M NaOH | 0,125 g NaOH/g biomase | 23°C, 90 o/min, 24 ili 48 h, zatim neutralizirano koncentriranom HCl, tretirano katalazom kako bi se uklonio preostali H ₂ O ₂ , zagrijano do 90°C, 15 min kako bi se inaktivirala katalaza te liofilizirano. | Visoki prinosi monomera glukoze i ksiloze pri niskim koncentracijama enzima. | Enzimska saharifikacija do monomera glukoze i ksiloze | Ova metoda predobrade se čini prikladnom za daljnja poboljšanja koja bi mogla dovesti do njezinog razvoja kao ekonomski održivog koraka u pretvorbi lignoceluloze do etanola. | Barreje i sur., (2011) |
| < 5 mm , udio vlage 10% | Različite konc. NaOH (1; 2,5; 5,0 i 7,5 % (w/w)). | 200 g kukuruzovine + 200 ml otopine NaOH | Kukuruzovina natopljena s NaOH držana je na sobnoj temperaturi (20 ± 0.5 °C), 24 h u zatvorenoj plastičnoj vrećici. | Porastom koncentracije NaOH od 1% do 7,5% dolazi do povećanja razgradnje lignina od 9,1% do 46,2%. Pri koncentraciji NaOH od 7,5% gubitak hemiceluloze je iznosio 13,8%. Razgradnja celuloze je niska. | Anaerobna razgradnja u čvrstom stanju | Iz kukuruzovine podvrgnutom predobradi proizvedeno je 37% više biogoriva u usporedbi s neobrađenom, no kod viših koncentracija NaOH (7,5%) dolazi do inhibicije metanogeneze, zbog brze hidrolize i acidogeneze. | Zhu i sur., (2010) |

33

Tablica 6. (nastavak)

| Dimenzije i % s.tv. sirovina | Kemikalija (konc.) | Omjer kemikalija / sirovina, omjer kruto / tekuće | Vrsta i parametri obrade | Učinak procesa predobrade | Korištenje nakon predobrade | Napomena | Referenca |
|------------------------------|--------------------|---|---|---|--|--|---------------------|
| Frakcije 20 – 80 mesh | NaOH, 1 wt% | - | Biomasa je tretirana s NaOH (1 wt%) na 120°C 1 h, nakon čega je filtrirana i oprana vodom do pH 7- 8 i osušena u pećnici na 80 °C 24 h. | udio lignina neobrađene kukuruzovine iznosio je 17,2 %, a obrađene 8,2 % te je delignifikacija iznosila 75%. | Simultana saharifikacija i fermentacija (SSF), s C. <i>saccharobutylicum</i> DSM 13864 | Prinos butanola je iznosio 0.175 g/g predobrađene kukuruzovine, a produktivnost 0.257 g/L/h. | Dong i sur., (2016) |
| < 1,3 cm (rezni mlin) | NaOH | | 100 – 140 °C, 40 – 70 mg NaOH/g s.tv. kukuruzovine i 0.05% - 0.2% (w/w) AQ (antrakinona). | Maksimalni prinos lignina bio je 54%, kislina 18 % i arabinana 59 % pri 140 °C i 70 mg NaOH/g s.tv. kukuruzovine. | Enzimaska hidroliza, omjer celidaze (Cellic Ctec3) i H1ec3) iznosio je 8:2. | Pri višim temperaturama i većim konc. NaOH postižu se veći prinosi monomera glukoze i ksiloze. | Kuhn i sur., (2016) |

Tablica 7. Primjeri i učinci alkalne predobrade pšenične slame.

| Dimenzije i % s.tv. sirovina | Kemikalija (konc.) | Omjer kemikalija / sirovina, omjer kruto / tekuće | Vrsta i parametri obrade | Učinak procesa predobrade | Korištenje nakon predobrade | Napomena | Referenca |
|--|--|---|--|---|--|---|-----------------------|
| 60 mesh (laboratorijski mlin Chrifite) | H ₂ O ₂ , tekući NH ₃ , Ca(OH) ₂ , KOH, NaOH i LiOH (1.5%) | 2,5 g slame /100 ml otopine | 1,5% H ₂ O ₂ , tekući NH ₃ , Ca(OH) ₂ , KOH, NaOH i LiOH 6 h na 20°C, 1,5% NaOH pri 20°C na zraku 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 i 144 h, 1,5% NaOH 6 h na 0, 20, 40, 60 i 80°C i 0,5, 1,5, 3,0, 5,0 i 10,0% NaOH 6 h na 20°C. | Pokazalo se da su optimalni uvjeti za delignifikaciju i otapanje hemiceluloze 1,5% NaOH 144 h na 20°C, doveli su do oslobađanja 6 % lignina i 80% hemiceluloze. | - | - | Sun i sur., (1995) |
| 1 – 2 cm (ručno nasjeckan), 9,85% vlage | NaOH, 0,5 % | 9,98 g slame + 600 ml vode (25°C) ili prethodno zagrijane otopine NaOH (0,5 %, 80 °C) | Mehanički obrađena sirovina dalje je tretirana otopinama NaOH/urea ili amonijak/urea, tako što je 8 g sirovine namočeno u 100 g prethodno ohlađene smjese lužine/uree i destilirane vode na -20 °C 6 h. Smjesa je snažno miješana na 200 o/min, 2 min, te isprana i filtrirana. | Kod sirovina prethodno obrađene otopinom NaOH /urea niške temperature došlo je do brže hidrolize, razgradljivost celuloze iznosila je 95,6%, a kod samo mehanički obrađene 34 %. Također, uklonjeno je gotovo pola početnog lignin. | Enzimaska hidroliza (celulaza, 10 FPU/g supstrata na 2% čvrste podloge(w/v) u acetalnom puferu (50 mM, pH 4.8), 50 ppm tetraciklina kao antibiotika i inkubirano na tresilici na 50 °C pri 200 o/min). | - | Wang i sur., (2014) |
| 2 mm (mlin čekičar) 45% celuloze, 21,3% hemiceluloze i 19% lignina | NaOH, 2,5% | 1:10 (omjer kruto/tekuće) | sobna temperatura/1 h, zatim autoklav pri 121 °C (različita vremena: 30, 60, 90 i 120 min) | 121 °C/ 90 min ima snažan učinak na supstrat, postignut je maksimalni sadržaj celuloze od 83 %, delignifikacija od 81 % i sadržaj hemiceluloze od 10,5%. | Enzimaska hidroliza (celulaza, aktivnost 2900 IU/mL i aktivnost na filter papiru 1500 FPU/mL) | SEM i FTIR spektroskopija je potvrdila strukturne modifikacije uzrokovane alkalnom predobradom. | Asghar i sur., (2014) |

Tablica 7. (nastavak)

| Dimenzije i % s.tv. sirovina | Kemikalija (konc.) | Omjer kemikalija / sirovina, omjer kruto / tekuće | Vrsta i parametri obrade | Učinak procesa predobrade | Korištenje nakon predobrade | Napomena | Referenca |
|--|---|--|--|---|---|---|-------------------------|
| 2 mm (rezni mlin) | Otopine NaOH i Ca(OH) ₂ | 20 g mijevene slame + 200 mL otopine NaOH i Ca(OH) ₂ | Optimalni uvjeti : 80°C, 39 min, 0,18 g NaOH i 0,06 g vapna po g sirove biomase | Nakon predobrade uklonjeno je 62,5 ± 1,7% lignina. | Enzimaska hidroliza (celulaza NS22086, 35 FPU/g suhe tvari) 5% w/w uzorka u natrij-citrat puferu (pH 5) na 45°C u tresilici 120 o/min. | Nakon enzimске hidrolize postignuto je 93,1 ± 1,0% konverzije celuloze u glukozu i 803 ± 1,2% prinosa monosaharida (glukoza, ksiloza i arabinoza) iz celuloze i hemiceluloze. | Jaisamut i sur., (2013) |
| < 1 mm | 4 % NaOH | 0,8 g NaOH (u prahu) + 20 g slame + voda kako i se dobio udio krute tvari 10 % | Inkubirano 120 h (5 dana), na 37 °C. Provedena je i hidrotermalna predobrada na 200 °C, 10 min. | Kod supstrata tretiranog s 4% NaOH došlo je do povećanja proizvodnje bioplina za 87,5 %, a metana za 111,6 % u usporedbi s neoobrađenom slamom. | Anaerobna obrada | - | Chandra i sur., (2012) |
| 0,9-0,75 mm (20 mesh), 0,5-0,3 mm (40 mesh) 0,3-0,2 mm (60 mesh) | 0,5% H ₂ SO ₄ i 0,875% alkalnog H ₂ O ₂ | - | Predobrada razrijeđenom kiselinom provodila se u autoklavu na 140 °C, 90 min, a predobrada alkalnim peroksidom provodila se na 55 °C, 4 h (5 g slame dodano 100 ml otopine, pH 11,5, na tresilici pri 180) o/min). | Udio celuloze u sirovj slami iznosio je 42,81%, nakon predobrade alkalnim peroksidom porastao je na 71,30% i bio je veći u usporedbi sa slamom obrađenom kiselinom. | Kofermentacija sa <i>S. cerevisiae</i> i <i>P. stipitis</i> za proizvodnju etanola. Prinos etanola kod predobrade razrijeđenom kiselinom iznosio je 12,95%, a za predobradu alkalnim peroksidom 18,23%. | Predobrada alkalnim peroksidom pokazala se učinkovitijom metodom za povećanje proizvodnje bioetanola iz pšenične slame kofermentacijom. | Karagöz i Özkan, (2013) |

Tablica 7. (nastavak)

| Dimenzije i % s.tv. sirovina | Kemikalija (konc.) | Omjer kemikalija / sirovina, omjer kruto / tekuće | Vrsta i parametri obrade | Učinak procesa predobrade | Korištenje nakon predobrade | Napomena | Referenca |
|---|---|---|---|--|--|--|---------------------------|
| 1 mm (kuhinjski blender), udio vlage manji od 10% | NaOH različite konc. (1 i 10 % g NaOH /g ukupne s.tv.) | omjer kruto/tekuće 160 g/L | Uzorci su namakani u otopini NaOH različitih koncentracija u zatvorenim bocama na 40 °C, 24 h, bez miješanja. | Kod najveće koncentracije NaOH došlo je do smanjenja udjela celuloze za 13 %, hemiceluloze za 45 % i lignin za 3 %, a udio ukupnih šećera povećao se i do 5 puta. | Anaerobna razgradnja. | Kod koncentracija NaOH od 1% i 10% proizvodnja metana porasla je sa 17 % na 47%. | Sambusti i sur., (2012) |
| 1-3 mm, udio vlage manji od 10 % | otopine H ₂ SO ₄ , HCl, HNO ₃ i KOH (1%) | 100 g uzorka slame + 1000 ml 1% otopine kiseline ili lužine | Temperatura 130 °C, tlak 3 bara, 60 min, ohlađeno (ispod 50 °C) te je dodan K ₂ CO ₃ ili HCl za neutralizaciju pH. | Najveća stopa konverzije celuloze u glukozu od 316,7 g/kg dobivena je predobradom s HNO ₃ , a najmanja koncentracija glukoze od 221,3 g/kg dobivena je predobradom s HCl. | Enzimaska hidroliza (celuloze) i fermentacija (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> was) | Za proizvodnju etanola kao najbolja pokazala se predobrada s KOH kombinirana s pranjem uzorka prije hidrolize. | Tutt i sur., (2012) |
| 20 – 240 mesh | NaOH (0,25–1,5 % w/v) | - | Smijesa slame i otopine NaOH je tretirana na 121 °C, 15 psi, 0,5 do 2,5 h, a kao optimalna pokazala se predobrada čestica veličine 120 mesh sa 1,0 % NaOH, 1,5 h. | Sadržaj celuloze povećao se za 44,52 %, a sadržaj hemiceluloze i lignina smanjio se za 44,15% i 42,52%. | Enzimaska hidroliza (celuloza koju proizvodi <i>Penicillium waksmanii</i> F10-2). Optimalni uvjeti: 30 h, 55°C, pH 5,5, koncentracija supstrata 3 %. | - | Han i sur., (2012) |
| < 1.5 mm (rotacioni mlin) | NaOH, različite konc.: 0, 0,75, 1,0, i 2,0 % (w/v) | - | Predobrada je izvršena na dvije temperature, na 60 °C u vodenoj kupelji i na 120 °C u autoklavu u vremenima zadržavanja od 30, 60 i 90 min. Nakon čega su netopljive krute čestice odvojene od tekuće frakcije pomoću Bucherovog lijevka, te su isprane vodom do pH 7, zatvorene u plastične vrećice i pohranjene na 20 °C. | Povišnje temperature i alkaline jakosti dovelo je do maksimalne topljivosti hemiceluloze i lignina, te je povećalo enzimsku saharifikaciju. | Enzimaska hidroliza (celuloza (NS50013), β-glukozidaza (NS50010) i ksilanaza (NS50030)) | - | McIntosh i Vancov, (2011) |

Tablica 7. (nastavak)

| Dimenzije i % s.tv. sirovina | Kemikalija (konc.) | Omjer kemikalija / sirovina, omjer kruto / tekuće | Vrsta i parametri obrade | Učinak procesa predobrade | Korištenje nakon predobrade | Napomena | Referenca |
|---|-------------------------------------|---|---|--|--|---|---------------------------|
| 400 µm - 1 mm (reznj mljn), sastav: lignin 23,0 ± 0,4 %, celuloza 32,5 ± 0,2 %, hemiceluloza 28,8 ± 0,2 % | CaO, 10 % | - | 10% CaO na 72°C 24 h | Sastav nakon predobrade: lignin 21,0 ± 0,2%, celuloza 32,1 ± 0,6%, hemiceluloza 21,7 ± 0,2%. | Anaerobna razgradnja mikroalgia i pšenične slame. (50% mikroalge - 50% pšenična slama) | Zajedničkom razgradnjom mikroalgia i pšenične slame povećao se prinos metana za 77 % u usporedbi s razgradnjom samo mikroalgia. Predobrada je dovela do povećanja prinosa metana od 15 %. | Solá-Bundó i sur., (2017) |
| 1 cm (mljn čekićar) | KOH različitih konc. 2 - 50 % (w/w) | - | Pšenična slama je tretirana s otopinama KOH različitih koncentracija 2 - 50% (w/w) 24 h na 20 °C. | Veće koncentracije KOH rezultirale su uklonjenjem većeg udjela lignina. Maksimalni udio uklonjenog lignina od 54,7% postignut je pri koncentraciji KOH od 50%. | Enzimska hidroliza (Cellic CTec2 i Cellic HTec2) i termoflina anaerobna razgradnja. | - | Li u sur., (2015) |

Na temelju činjenica navedenih u teorijskom dijelu doneseni su sljedeći zaključci:

1. Lignocelulozne sirovine su biljna biomasa koja uključuje ostatke iz drvne industrije (ostaci drva i piljevina), prehrambene industrije (otpad uljarica, koštice i kore voća, ostaci povrća), poljoprivrede (kukuruzovina, kukuruzni oklasci, pšenična slama i ječmena slama) te komunalni otpad. Nekada su takvi ostaci bili tretirani kao otpad i njihova vrijednost je bila niska, dok se u današnje vrijeme njihovom obradom dobivaju različiti proizvodi visoke vrijednosti.
2. Mogućnosti korištenja lignoceluloznih materijala su brojne pa se tako mogu koristiti u mnogim biotehnološkim postupcima za dobivanje proizvoda visoke dodane vrijednosti i biogoriva.
3. Lignocelulozne sirovine sastoje se od tri glavne komponente, a to su celuloza, hemiceluloza i lignin. Zbog svoje kompleksne strukture lignocelulozni materijali su teško razgradivi. Stoga je prije korištenja potrebna odgovarajuća predobrada, čiji odabir ovisi o planiranom biotehnološkom procesu.
4. Veličina čestica lignocelulozne sirovine koja se podvrgava predobradi izravno utječe na enzimsku razgradnju lignoceluloze. Međutim, utjecaj veličine čestica je manji od utjecaja drugih faktora, poput uklanjanja lignina i hemiceluloze. Zbog toga sama mehanička obrada nije dovoljna za postizanje ekonomski isplativog prinosa konverzije. O vrsti predobrade i o vrsti sirovine ovisi potrebna veličina čestica i usitnjavanje čestica provodi se različitim mehaničkim postupcima.
5. Budući da je usitnjavanje energetski zahtjevan proces, troškovi smanjenja čestica mogu značajno utjecati na cijenu sirovina. S ekonomskog stajališta važno je razmotriti stupanj usitnjavanja, ali i skladištenje i transport biomase koji također utječu na konačnu cijenu sirovina. Stoga je bitno odrediti najefikasniji i ekonomski najisplativiji proces usitnjavanja.

- Aboagye D., Banadda N., Kambugu R., Seay J., Kiggundu N., Zziwa A., Kabenge I. (2017) Glucose recovery from different corn stover fractions using dilute acid and alkaline pretreatment techniques. *Journal of Ecology and Environment* **41**(26): 1-11.
- Alriksson, B. (2006) Ethanol from lignocellulose: Alkali detoxification of dilute-acid spruce hydrolysates. Dissertation for the degree of Doctor of Science in Technology, Karlstad University Studies.
- Anonymous 1 (2017) Pamučna vlakna (eng. cotton linters), < <http://shaktiagrotech.com/cotton-linter/>> Pristupljeno 25. Srpnja 2017
- Anonymous 2 (2017) Bagasa, < <http://feeco.com/photo-week-dried-bagasse/> > Pristupljeno 25. Srpnja 2017
- Anonymous 3 (2017) Ostaci prilikom odvajanja pamuka (eng. cotton gin trash), <<http://www.gocpc.com/converts-biomass-to-energy.html>> Pristupljeno 25. Srpnja 2017
- Anonymous 4 (2017) *Brassica carinata*, <http://www.africa.upenn.edu/faminefood/category3/cat3_Brassica_carinata.html> Pristupljeno 25. Srpnja 2017
- Asghar U., Irfan M., Iram M., Huma Z., Nelofer R., Nadeem M., Syed Q. (2015) Effect of alkaline pretreatment on delignification of wheat straw. *Natural Product Research* **29**(2): 125-31.
- Ballesteros I., Oliva J. M., Negro M. J., Manzanares P., Ballesteros M. (2002) Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particle sizes. *Process Biochemistry* **38**(2): 187–192.
- Bandikari R., Poondla V., Obulam V. S. R. (2014) Enhanced production of xylanase by solid state fermentation using *Trichoderma koenigi* isolate: effect of pretreated agro-residues. *3 Biotech* **4**(6): 655–664.
- Banerjee G., Car S., Scott-Craig J.S., Hodge D.B., Walton J.D. (2011) Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. *Biotechnology for Biofuels* **4**(16): 1-15.
- Buljubašić, M. (2012) Mogućnosti korištenja lignoceluloznih sirovina poljoprivrednog porijekla u Republici Hrvatskoj. Završni rad. Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Carrasco F., Roy, C. (1992) Kinetic study of dilute-acid prehydrolysis of xylan-containing biomass. *Wood Science and Technology* **26**(3): 189–208.

- Chandra R., Takeuchi H., Hasegawa T., Kumar R. (2012) Improving biodegradability and biogas production of wheat straw substrates using sodium hydroxide and hydrothermal pretreatments. *Energy* **43**(1): 273-282.
- Chen Y., Stevens M.A., Zhu Y., Holmes J., Xu H. (2013) Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnology for Biofuels* **6**(8): 1-10
- Dong J. J., Ding J. C., Zhang Y., Ma L., Xu G. C., Han R. Z., Ni Y. (2016) Simultaneous saccharification and fermentation of dilute alkaline-pretreated corn stover for enhanced butanol production by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 2016. *FEMS Microbiology Letters* **363**(4): 1-6.
- Gao K., Rehmann L. (2014) ABE fermentation from enzymatic hydrolysate of NaOH-pretreated corncobs. *Biomass and Bioenergy* **66**: 110–115.
- Han L., Feng J., Zhang S., Ma Z., Wang Y., Zhang X. (2012) Alkali pretreated of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Brazilian Journal of Microbiology* **43**(1):53-61.
- Harmsen, P.F.H, Huijgen, W.J.J., Bermúdez López, L.M., Bakker, R.R.C. (2010) Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. <<http://www.ecn.nl/docs/library/report/2010/e10013.pdf>> Pristupljeno 5. srpnja 2017.
- Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **100**(1): 10–18
- Himmel M., Tucker M., Baker J., Rivard C., Oh K., Grohmann K. (1985) Comminution of biomass: hammer and knife mills. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* **15**: 39–58.
- Holtzapfel M. T., Humphrey A. E., Taylor J. D. (1989) Energy requirements for the size reduction of poplar and aspen wood. *Biotechnology and Bioengineering* **33**(2): 207–210.
- Ioelovich M. (2014) Correlation analysis of enzymatic digestibility of plant biomass. *Biomass Conversion and Biorefinery* **4**(3): 269-275.
- Ioelovich M., Morag E. (2012) Study of enzymatic hydrolysis of mild pretreated lignocellulosic biomasses. *BioResources* **7**(1), 1040-1052.
- Jaisamut K., Paulová L., Patáková P., Rychtera M., Melzoch K. (2013) Optimization of alkali pretreatment of wheat straw to be used as substrate for biofuels production. *Plant Soil Environ* **59**(12): 537–542.
- Karagöz P., Özkan M. (2013) Optimization of dilute acid and alkaline peroxide pretreatment to enhance ethanol production from wheat straw. *Turkish Journal of Biochemistry–(Turk J Biochem)* **38**(4): 457–467.

- Kim S. B., Lee, Y. Y. (2002) Diffusion of sulfuric acid within lignocellulosic biomass particles and its impact on dilute-acid pretreatment. *Bioresource Technology* **83**(2): 165–171.
- Kim T.H., Kim J.S., Sunwoo C., Lee Y.Y., (2003) Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresource Technology* **90**(1): 39–47.
- KuhnE. M., O'Brien M. H., Ciesielski P. N., Schell D. J. (2016) Pilot-Scale Batch Alkaline Pretreatment of Corn Stover. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **4**(3): 944–956.
- Laine, C. (2005) Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. Dissertation for the degree of Doctor of Science in Technology, Helsinki University of Technology.
<<http://lib.tkk.fi/Diss/2005/isbn9512276909/isbn9512276909.pdf>> Pristupljeno 5. srpnja 2017.
- Liu X., Zicari S.M., Liu G., Li Y., Zhang R. (2015) Pretreatment of wheat straw with potassium hydroxide for increasing enzymatic and microbial degradability *Bioresource Technology* **185**: 150–157
- Luo W., Wang J., Liu X., Li H., Pan H., Gu Q., Yu X. (2013) A facile and efficient pretreatment of corncob for bioproduction of butanol. *Bioresource Technology* **140**: 86–89.
- Maloney M. T. (1986) An engineering analysis of the production of xylose by dilute-acid hydrolysis of hardwood hemicellulose. *Biotechnology Progress* **2**(4): 192–202.
- Masud Hossain S.K. (2013) Bioethanol fermentation from non-treated and pretreated corn stover using *aspergillus oryzae*. *Chemical engineering research bulletin* **16**(1): 33-44.
- Palonen, H. (2004) Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose, Dissertation for the degree of doctor of technology VTT Technical Research Centre of Finland,
<<http://lib.tkk.fi/Diss/2004/isbn9513862720/isbn9513862720.pdf>> Pristupljeno 31. svibnja 2017.
- Rivers D. B., Emert G. H. (1987) Lignocellulose pretreatment: a comparison of wet and dry ball attrition. *Biotechnological Letters* **9**(5): 365–368.
- Rivers D. B., Emert, G. H. (1988) Factors affecting the enzymatic hydrolysis of municipal solid waste components. *Biotechnology and Bioengineering* **31**(3): 278–281.
- Rivers D. B., Emert, G. H. (1988) Factors affecting the enzymatic hydrolysis of bagasse and rice straw. *Biol Wastes* **26**(2): 85–95.
- S. McIntosh, T. Vancov (2011) Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw *Biomass and bioenergy* **35**(7): 3094-3103.

- Saha B.C., Cotta, M.A., (2014) Alkaline Peroxide Pretreatment of Corn Stover for Enzymatic Saccharification and Ethanol Production. *Industrial biotechnology* **10**(1): 34-41.
- Sahare P., Singh R., Laxman R. S., Rao M. (2012) Effect of Alkali Pretreatment on the Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Corn Cob. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **168**(7): 1806–1819.
- Sambusiti C., Ficara E., Rollini M., Manzoni M., Malpei F. (2012) Sodium hydroxide pretreatment of ensiled sorghum forage and wheat straw to increase methane production. *Water Science & Technology* **66**(11): 2447 – 2452.
- Singh D. P., Trivedi R. K. (2013) Acid And Alkaline Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass To Produce Ethanol As Biofuel. *International Journal of ChemTech Research* **5**(2): 727-734. April-June
- Solé-Bundó M., Eskicioglu C., Garfí M., Carrère H., Ferrer I., (2017) Anaerobic co-digestion of microalgal biomass and wheat straw with and without thermo-alkaline pretreatment, *Bioresource Technology* **237**: 89-98.
- Soontornchaiboon W., S.M. Kim, Pawongrat R. (2016) Effects of Alkaline Combined with Ultrasonic Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Agricultural Wastes for High Reducing Sugar Production. *Sains Malaysiana* **45**(6): 955–962.
- Sun R., Lawther J.M., Banks W.B. (1995) Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw. *Industrial Crops and Products* **4**(2): 127-145.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technol.* **83**(1): 1-11.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **9** (9), 1621-1651.
- Torre P., Aliakbarian B., Rivas B., Domínguez J. M., Converti A. (2008) Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. *Biochem. Eng. J.* **40**(3): 500–506.
- Tutt M., Kikas T., Olt J. (2012) Influence of different pretreatment methods on bioethanol production from wheat straw. *Agronomy Research Biosystem Engineering Special Issue* **1**: 269-276.
- Varga E., Thomsen A. B., Feng L. (2005) Ethanol production from corn, corn stover and corn cob from the Jilin province of China. Technologies for Sustainable Energy Development in the Long Term. Riso International Energy Conference, proceedings (edited by L.S. Petersen & H. Larsen), 23 – 25 May 2005, Raskild, 369 – 378.

4. Literatura

- Vidal Jr. B. C., Dien B. S., Ting K. C., Singh V. (2011) Influence of Feedstock Particle Size on Lignocellulose Conversion—A Review. *Appl Biochem Biotechnol* **164**(8):1405–1421.
- Wang Q., Zhu Q., Xu J., Sun J. (2014) Combined Mechanical Destruction and Alkaline Pretreatment of Wheat Straw for Enhanced Enzymatic Saccharification. *BioResources* **9**(4): 6841-6850.
- Zheng M., Li L., Li X., Xiong, J., Mei T., Chen G. (2010) The Effects of Alkaline Pretreatment Parameters on Anaerobic Biogasification of Corn Stover. *Energy Sources, Part A*, **32**(20): 1918–1925.
- Zheng M., Li X., Li L., Yang X., He Y. (2009) Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment. *Bioresource Technology* **100**(21): 5140–5145.
- Zhu H.-J., Liu J.-H., Sun L.-F., Hua Z.-F., Qiao J.-J. (2013) Combined alkali and acid pretreatment of spent mushroom substrate for reducing sugar and biofertilizer production. *Bioresource Technology* **136**: 257–266.
- Zhu J., Wan C., Li Y. (2010) Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment. *Bioresource Technology* **101**(19): 7523–7528.

Izjava o izvornosti

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

Karla Mark

ime i prezime studenta