

Proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatu pšenične slame dobivenom alkalnom predobradom u visokotlačnom reaktoru

Vidović, Petra

Master's thesis / Diplomski 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:159:520516>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO–BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 21.srpnja 2017. godine

Petra Vidović

862/BPI

**Proizvodnja mliječne kiseline na
hidrolizatu pšenične slame
dobivenom alkalnom predobradom u
visokotlačnom reaktoru**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Božidara Šanteka, redovitog profesora u trajnom zvanju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr. sc. Antonije Trontel, više asistentice.

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

ZAHVALA:

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

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

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

PROIZVODNJA MLIJEČNE KISELINE NA HIDROLIZATU PŠENIČNE SLAME DOBIVENOM ALKALNOM PREDOBRADOM U VISOKOTLAČNOM REAKTORU

Petra Vidović, 862/BPI

Sažetak:

Otpadne lignocelulozne sirovine, u odnosu na šećerne i škrobne sirovine koje se uvelike koriste za prehranu ljudi i životinja, predstavljaju održivu alternativu za proizvodnju biokemikalija kao što je mliječna kiselina. U ovom radu provedena je predobrada pšenične slame s 2 %-tnom natijevom lužinom u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama (120°C-210°C) i vremenima zadržavanja od 1 do 20 minuta. Nakon predobrade pšenične slame, dobivene su dvije faze (čvrsta i tekuća faza) te je određen njihov sastav. Čvrsta faza (predobrađena pšenična slama) koja se sastoji većinom od glukana ($w_{\text{glukan}} = 87,36\%$) korištena je za hidrolizu komercijalnim celulazama i β -glukozidazom izoliranim iz plijesni *Aspergillus niger*. Nakon optimizacije enzimske hidrolize, dobiveni hidrolizati korišteni su za proizvodnju mliječne kiseline s pomoću bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T. Provedena je i simultana hidroliza s celulazama i β -glukozidazom iz plijesni *A. niger* i fermentacija predobrađene pšenične slame do mliječne kiseline pomoću *L. amylovorus* DSM 20531^T, pri čemu su ostvareni ovi pokazatelji uspješnosti procesa: $Y_{PS} = 0,30$ i $0,33$ g g⁻¹, $Pr_{MK} = 0,23$ i $0,24$ g L⁻¹ h⁻¹, $\mu_m = 0,30$ i $0,31$ h⁻¹ (celulaze, celulaze + β -glukozidaza).

Ključne riječi: *Lactobacillus amylovorus*, pšenična slama, predobrada lužinom u visokotlačnom reaktoru, enzimska hidroliza, celulaze, β -glukozidaza, fermentacija, mliječna kiselina

Rad sadrži: 75 stranica, 28 slika, 16 tablica, 63 literaturne reference, 3 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof.dr.sc. Božidar Šantek

Pomoć pri izradi: dr.sc. Antonija Trontel

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
2. Prof.dr.sc. Božidar Šantek
3. Izv. prof.dr.sc. Tonči Rezić
4. Doc.dr.sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjena)

Datum obrane: 21. srpnja 2017. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

LACTIC ACID PRODUCTION FROM WHEAT STRAW HYDROLYSATES FROM ALKALI PRETREATMENT IN HIGH-PRESSURE REACTOR

Petra Vidović, 862/BPI

Abstract:

Residual lignocellulosic biomass, in contrast to sugar and starch containing raw materials which are widely used as food and feed, represents sustainable alternative for production of biochemicals, e.g. lactic acid. In this work, alkali pretreatment of wheat straw with 2 % sodium hydroxide solution in high-pressure reactor at different temperatures (from 120°C to 210°C) and residence times (from 1 to 20 minutes) was performed. After alkali pretreatment of wheat straw, solid and liquid phase were obtained and composition of the two phases was determined. Solid phase (pretreated wheat straw), comprised mostly of glucans ($w_{\text{glukan}} = 87,63 \%$), was used for hydrolysis with commercial cellulases and β -glucosidases isolated from mold *Aspergillus niger*. After optimization of enzymatic hydrolysis, obtained hydrolysates were used for lactic acid production by lactic acid bacterium *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T. Additionally simultaneous hydrolysis with commercial cellulases and β -glucosidases isolated from *A. niger* of solid phase obtained after the pretreatment of wheat straw and fermentation of simpler carbohydrates to lactic acid by *L. amylovorus* DSM 20531^T, where following values of bioprocess efficiency parameters were obtained: $Y_{P/S} = 0,30$ and $0,33 \text{ g g}^{-1}$, $Pr_{MK} = 0,23$ and $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $\mu_m = 0,30$ and $0,31 \text{ h}^{-1}$ (cellulases, cellulases and β -glucosidases).

Keywords: *Lactobacillus amylovorus*, wheat straw, alkali pretreatment in high-pressure reactor, enzymatic hydrolysis, cellulase, fermentation, lactic acid

Thesis contains: 75 pages, 28 figures, 16 tables, 63 references, 3 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD Božidar Šantek, Full professor

Technical support and assistance: PhD Antonija Trontel

Reviewers:

1. PhD Blaženka Kos, Full professor
2. PhD Božidar Šantek, Full professor
3. PhD Tonči Rezić, Associate professor
4. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor (substitute)

Paper defended: July 21st 2017

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. LIGNOCELULOZNA BIOMASA.....	2
2.1.1. Celuloza.....	3
2.1.2. Hemiceluloza.....	4
2.1.3. Lignin	5
2.2. PREDOBRAĐA LIGNOCELULOZNE BIOMASE	6
2.2.1. Predobrada lignoceluloznih sirovina lužinama	9
2.2.2. Nastanak inhibitora tijekom procesa predobrade lignoceluloznih sirovina.....	11
2.3. ENZIMSKA HIDROLIZA PREDOBRAĐENIH LIGNOCELULOZNIH SIROVINA	12
2.3.1. Inhibicija celulolitičkih enzima	14
2.4. PROIZVODNJA MLIJEČNE KISELINE IZ LIGNOCELULOZNIH SIROVINA	14
2.4.1. Bakterije mliječne kiseline	15
2.4.1.1. Rod <i>Lactobacillus</i>	16
2.4.1.1.1. <i>Lactobacillus amylovorus</i>	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Sirovina	18
3.1.2. Enzimi	18
3.1.3. Mikroorganizam	19
3.1.4. Kemikalije i hranjive podloge	19
3.1.4.1. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterijskih kultura	20
3.2. APARATURA I PRIBOR.....	20
3.2.1. Uređaj za termičku predobradu lignoceluloznih sirovina	20
3.2.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC).....	22
3.2.3. Ostala oprema.....	22
3.3. METODE RADA.....	23
3.3.1. Određivanje sastava pšenične slame.....	23
3.3.2. Alkalna predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru s natrijevom lužinom.....	23
3.3.3. Enzimska hidroliza predobrađene pšenične slame.....	24
3.3.4. Priprava hranjivih podloga	25
3.3.5. Uzgoj bakterija <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T i proizvodnja mliječne kiseline na predobrađenoj pšeničnoj slami ..	27
3.3.6. Analitičke metode.....	28
3.3.6.1. Određivanje udjela suhe tvari	28
3.3.6.2. Određivanje udjela lignina topljivog u kiselini.....	29
3.3.6.3. Određivanje udjela netopivog lignina	29
3.3.6.4. Dvostupanjaska kiselinska hidroliza	29
3.3.6.5. Određivanje furfurala spektrofotometrijski	30
3.3.6.6. Određivanje optičke gustoće uzoraka hranjive podloge	30
3.3.6.7. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)	31
3.3.6.7.1. Priprema uzoraka čvrste faze za analizu HPLC metodom	31
3.3.6.7.2. Priprema uzorka tekuće faze za analizu HPLC metodom.....	31

3.3.6.7.3. Taloženje proteina iz uzoraka cinkovim sulfatom	32
3.3.6.7.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	32
3.4. IZRAČUNAVANJE POKAZATELJA USPJEŠNOSTI RASTA I PROIZVODNJE MLIJEČNE KISELINE... 33	
3.4.1. Prinos biomase (Y_X).....	33
3.4.2. Prinos produkta (Y_P)	33
3.4.3. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$).....	34
3.4.4. Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ($Y_{P/S}$)	34
3.4.5. Koeficijent nastajanja produkta po biomasi ($Y_{P/X}$).....	34
3.4.6. Brzina potrošnje supstrata (r_S).....	34
3.4.7. Brzina nastajanja produkta (r_P).....	35
3.4.8. Maksimalna specifična brzina rasta biomase (μ_m).....	35
3.4.9. Produktivnost (Pr).....	35
4. REZULTATI I RASPRAVA..... 36	
4.1. PREDOBRAĐA PŠENIČNE SLAME U VISOKOTLAČNOM REAKTORU ZA PREDOBRAĐU LIGNOCELULOZNIH SIROVINA..... 37	
4.1.1. Alkalna predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri 210°C i različitim vremenima zadržavanja.....	37
4.1.2. Alkalna predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama i vremenu zadržavanja od 20 minuta	39
4.2. ENZIMSKA HIDROLIZA PREDOBRAĐENE PŠENIČNE SLAME..... 44	
4.3. UZGOJ BAKTERIJE <i>L. amylovorus</i> DSM 20531^T I PROIZVODNJA MLIJEČNE KISELINE NA HIDROLIZATU PREDOBRAĐENE PŠENIČNE SLAME DOBIVENE NAKON ALKALNE PREDOBRADE.. 51	
4.3.1. Uzgoj bakterije <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T i proizvodnja mliječne kiseline na predobrađenoj pšeničnoj slami hidroliziranoj celulazama iz <i>A. niger</i>	52
4.3.2. Uzgoj bakterije <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T i proizvodnja mliječne kiseline na predobrađenoj pšeničnoj slami hidroliziranoj celulazama i β -glukozidazom iz <i>A. niger</i>	54
4.4. SIMULTANA HIDROLIZA PREDOBRAĐENE PŠENIČNE SLAME CELULOLITIČKIM ENZIMIMA I FERMENTACIJA S POMOĆU BMK <i>L. amylovorus</i> DSM 20531^T..... 57	
4.4.1. Simultana hidroliza predobrađene pšenične slame s celulazama iz <i>A. niger</i> i fermentacija s pomoću BMK <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T	58
4.4.2. Simultana hidroliza predobrađene pšenične slame s celulazama i β -glukozidazom iz <i>A. niger</i> i fermentacija s pomoću BMK <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 ^T	60
5. ZAKLJUČCI..... 63	
6. LITERATURA	65
7. PRILOZI..... 72	
7.1. POPIS KRATICA	72
7.2. BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UGLJIKOHIDRATA I PROIZVODA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)	73
7.3. BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FURANA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC).....	75

1. UVOD

Lignocelulozne sirovine su najrasprostranjeniji globalni izvor biomase koja se dobiva kao nusproizvod šumarstva i poljoprivredne proizvodnje. Otpadne lignocelulozne sirovine, u odnosu na šećerne i škrobne sirovine koje se uvelike koriste za prehranu ljudi i životinja, predstavljaju održivu alternativu za proizvodnju biokemikalija kao što je mliječna kiselina. Za proizvodnju mliječne kiseline mogu se koristiti lignocelulozni materijali poput slame, kukuruzovine, kukuruznih oklasaka, bagase šećerne trske i šećerne repe, ostaci dobiveni tijekom proizvodnje papira, trava, lišće i dr. Osnovnu strukturu ovih materijala čine celuloza, hemiceluloza i lignin, pri čemu njihovi udjeli ovise o vrsti lignocelulozne sirovine (Abdel-Rahman i sur., 2011). Glavne karakteristike mikroorganizama (npr. bakterije mliječne kiseline, plijesni *Rhizopus oryzae* i *R. arrhizus*), koji se istražuju za industrijsku proizvodnju mliječne kiseline, su „brza“ fermentacija „jeftine“ sirovine u mliječnu kiselinu uz male količine biomase i drugih proizvoda metabolizma (etanol, octena ili mravlja kiselina) te ostvarivanje visokih prinosa željenog stereoizomera mliječne kiseline. Budući da je lignoceluloza vrlo otporna na mikrobnu razgradnju (prisutnost lignina, stupanj kristalizacije i polimerizacije, vrsta površinskih polisaharida), nužno je provesti predobradu ovakve sirovine. Predobrada je proces kojim se lignocelulozna biomasa prevodi iz prirodnog oblika, nepristupačnog celulazama, u oblik koji je moguće hidrolizirati enzimima (Ashok, 2009.). Procesi predobrade koji se provode prije enzimske hidrolize mogu se podijeliti na: fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke postupke predobrade. Kako bi se ostvarila učinkovita hidroliza i zadovoljavajući prinosi mliječne kiseline, potrebno je provesti enzimsku hidrolizu predobrađene lignocelulozne sirovine. To je složen proces koji se odvija u dvofaznom sustavu čvrsto-tekuće kroz tri simultana procesa pomoću enzima celulaza (izoliranih iz bakterija, plijesni i gljiva; Sun i Cheng, 2002; Demirbas, 2005).

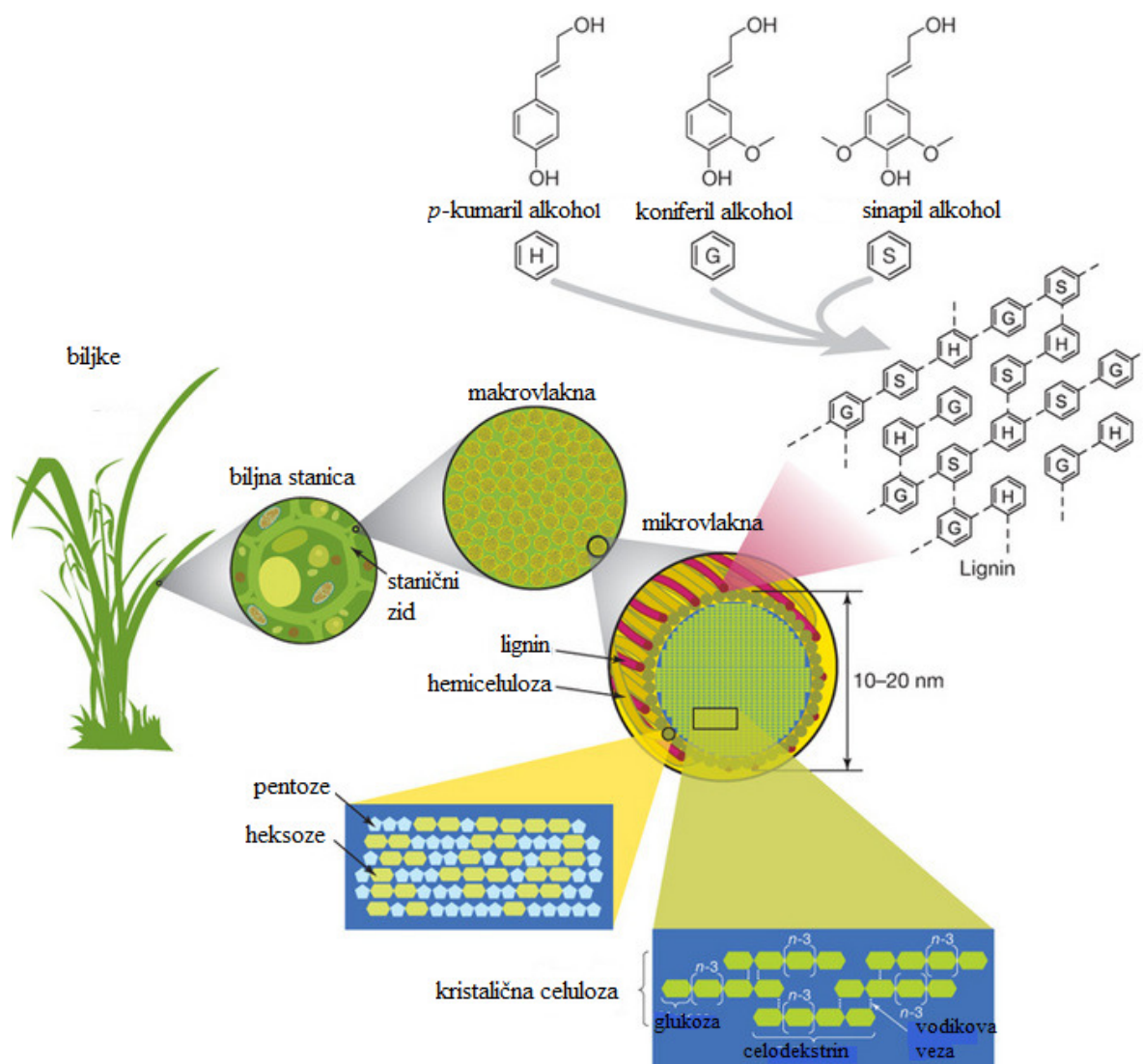
Cilj ovog rada bio je provesti predobradu pšenične slame s 2 %-tnom natrijevom lužinom u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama (120°C-210°C) i vremenima zadržavanja od 1 do 20 minuta, te odrediti optimalne uvjete predobrade pšenične slame lužinom. Nadalje, predobrađena pšenična slama korištena je kao sirovina za hidrolizu komercijalnim celulazama koje proizvodi plijesan *Aspergillus niger* te je provedeno optimiranje uvjeta enzimske hidrolize. Provedeni su procesi odvojene i simultane hidrolize predobrađene pšenične slame i fermentacije nastalih jednostavnih ugljikohidrata do mliječne kiseline.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIGNOCELULOZNA BIOMASA

Otpadna lignocelulozna biomasa je široko dostupna, obnovljiva i jeftina sirovina koja može poslužiti kao izvor energije (Mussatto i. Teixeira, 2010). Godišnje se na globalnoj razini proizvede oko 2×10^{12} tona lignocelulozne biomase što predstavlja oko 70 % ukupne biljne biomase (Mäki–Arvela i sur., 2011). Pojam lignocelulozne biomase podrazumijeva poljoprivredne ostatke (slama, kukuruzovina, kukuruzni oklasci, zelena i suha trava, repini ostaci), ostaci iz drvne industrije i industrije proizvodnje i prerade papira (piljevina, komadići drva, lišće, papirna pulpa, sulfitna lužina) te čvrsti gradski otpad (Anwar i sur., 2014; Palonen, 2004; Saini i sur., 2015). Lignocelulozni otpad akumulira se svake godine u velikim količinama, uzrokujući probleme u okolišu. Manji se dio lignocelulozne biomase koristi kao ogrjevni materijal (Holladay i sur., 2007). Međutim, zbog visokog udjela ugljikohidrata u lignoceluloznim sirovinama, postoje i istražuju se novi postupci pomoću kojih bi se ove sirovine mogle učinkovito koristiti za proizvodnju etanola, organskih kiselina i otapala, te visoko vrijednih proizvoda poput vitamina, enzima i biopolimera (Mussatto i Teixeira, 2010).

Lignocelulozne sirovine imaju složenu strukturu koju čine tri polimera: celuloza ($(C_6H_{10}O_5)_n$), hemiceluloza ($(C_5H_8O_4)_n$) i lignin ($(C_6H_{11}O_2)_n$), kao što je prikazano na Slici 1. (Walker, 2010; Emptage i sur., 2006), čiji se udjeli u biomasi razlikuju ovisno o sirovini iz koje ona potječe. Dok se celuloza i hemiceluloza mogu hidrolizirati do fermentabilnih šećera i iskoristiti u proizvodnji mliječne kiseline, lignin nije moguće prevesti u supstrat za fermentaciju (Walker, 2010). Celuloza i hemiceluloza čine prosječno 70 % cjelokupne mase te su čvrsto povezane sa ligninom kovalentnim i vodikovim vezama koje čine strukturu vrlo robusnom i otpornom na različite metode predobrade i hidrolize (Knauf i sur., 2004).

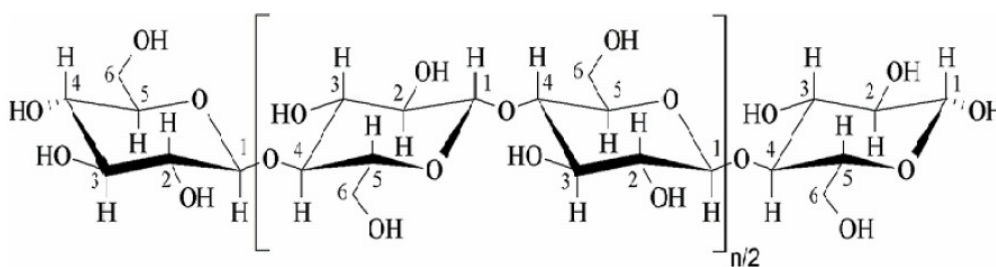


Slika 1. Struktura lignoceluloznih sirovina (Rubin, 2008).

2.1.1. Celuloza

Celuloza je glavna strukturna komponenta lignoceluloznih sirovina te je ujedno i najzastupljeniji prirodni polimer. Celuloza je linearni polimer te homopolisaharid ponavljajućih β -D-glukopiranoznih jedinica povezanih preko hidroksilnih skupina C1 i C4 β -glikozidnim vezama (Slika 2.), te je najzastupljeniji prirodni polisaharid građen od ponavljajućih jedinica celobioze, dimera glukoze (Hadar, 2013; Bajpai, 2016). Prosječna molekulska masa celulozne jedinice je 100 000 Da. Formiranje kristalične strukture celuloze, karakteristične za lignocelulozne sirovine, omogućeno je longitudinalnim povezivanjem lanaca celuloze (intra- i inter- molekularne vodikove veze između hidroksilnih (OH-) skupina unutar istog lanca celuloze i okolnih lanaca celuloze). Kristalična struktura celuloze je čvrsta i vrlo

otporna na različite postupke hidrolize (Olsson i Hahn-Hägerdal, 1996; Demirbas, 2008). Najveći dio celuloze u lignocelulozi se nalazi u kristaličnom obliku, te je vrlo mali udio celuloze amorfne strukture koja je dostupna djelovanju celulaznih enzima (Sjostrom, 1993). Duljina lanca celuloze značajno varira ovisno o stupnju polimerizacije, te tako u određenim molekulama može iznositi 9000 -10 000, a u nekim sirovinama i do 15 000 glukoznih jedinica (Rowell i sur., 2005). U staničnoj stijenci biljaka, molekule celuloze međusobno su povezane vodikovim vezama i tvore mikrovlakna, koja se dalje povezuju u vlakna (Sjostrom, 1993).



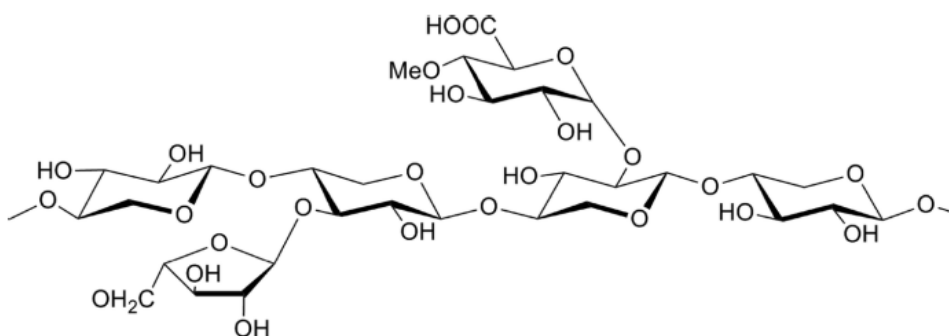
Slika 2. Struktura celuloze (Marques-Marino i Vianna-Soares, 2013).

2.1.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza je također prirodni heteropolimer manje molekulske mase i razgranate strukture koji je po kemijskim svojstvima vrlo različit od celuloze. Hemicelulozu mogu činiti: D-ksilaza, D-manoza, D-galaktoza, L-arabinoza, 4-O-metil-glukuronska kiselina, D-galakturonska i D-glukuronska kiselina. Sastav hemiceluloze ovisi o sirovini iz koje potječe a građevne jedinice međusobno su povezane β -1,4-glikozidnim vezama i β -1,3-glikozidnim vezama (Slika 3.). Kao što je navedeno, u hemicelulozi su osim heksoza prisutne i pentoze (Demirbas, 2008).

Glavni lanac hemiceluloze se može sastojati od samo jednog tipa monomera (npr. ksilana) ili različitih jedinica (npr. glukomanana, glukoza + manosa). Dominantna komponenta hemiceluloze u poljoprivrednim biljkama i drveću je ksilan (Saha, 2003). Ksilan hemiceluloze sastoji se od 1,4- β -D-ksilopiranoze povezanih β -1,4-glikozidnim vezama, dok pobočni ogranci mogu sadržavati 4-O-metilglukuronsku kiselinu ili galaktozu (Chen, 2014). Hemiceluloza služi kao poveznica između lignina i celuloznih vlakana i daje strukturi čvrstoću (Laureano-Perez i sur., 2005). Budući da sadrži veliki udio amorfne strukture od

različitih ugljikohidrata, hemiceluloza ima bolju topivost u vodi i lakše se razgrađuje od celuloze te je najosjetljivija na termički ili kemijski predtretman, u odnosu na celulozu i lignin (Levan i sur., 1990; Winandy, 1995).



Slika 3. Kemijska struktura hemiceluloze (Chen i sur., 2014).

2.1.3. Lignin

Lignin je komponenta koja lignoceluloznim sirovinama daje mehaničku potporu i nepropusnost. Lignin je amorfni aromatski heteropolimer, netopljiv u vodi i optički inaktivan, građen od brojnih polifenolnih spojeva koji su međusobno povezani vezama koje se ne mogu razgraditi. Građevne jedinice lignina su prekursori fenilpropana (siringil, guacil i *p*-hidroksifenil) i vezani su zajedno različitim vrstama veza u vrlo kompleksni matriks (Demirbas, 2008). Na osnovnu strukturu lignina vezane su različite aktivne grupe (hidroksi, metoksi i karbonilne grupe) koje doprinose visokoj polarnosti molekule lignina (Demirbas, 2008).

Visoko je razgranata molekula koja čini ključnu komponentu stanične stijenke. Kao i celuloza i hemiceluloza, postotak lignina u staničnoj stijenci varira između različitih tipova biljaka (čini otprilike 15 - 20 % mase suhe tvari) te značajno smanjuje djelotvornost razgradnje celuloze i hemiceluloze tvoreći zaštitni sloj oko navedenih molekula (Bajpai, 2016). Faktori koji otežavaju hidrolizu sirovina su zastupljenost lignina u sirovini, stupanj i vrsta veza između lignina i ostalih polisaharida te raspodjela fenilpropanskih jedinica u samoj strukturi lignina (Ragauskas, 2014). Budući da njegova prisutnost smanjuje enzimsku razgradivost lignoceluloze, potrebno ga je na odgovarajući način ukloniti (Anwar i sur., 2014).

U manjoj koncentraciji, u lignoceluloznoj biomasi, zastupljeni su proteini, pepeo, organske kiseline, pektin, spojevi s dušikom i drugi spojevi. Pojam pepeo podrazumijeva bilo koju anorgansku materiju, u pravilu silicij (Sluiter i sur., 2013). Budući da se dio anorganskih soli može otopiti tijekom ekstrakcije, udjel pepela se uglavnom određuje prije i nakon određivanja ekstraktivnih tvari (Hames, 2009). Ekstraktivne tvari su kompleksne smjese koje se u biljnoj stanici nalaze u malim koncentracijama (smole, steroli, tanini, terpeni, kinoni, flavonidi, itd.). Proteini su kompleksne polimerne strukture koje se sastoje od lanaca aminokiselina te njihov oblik i udjel ovise o podrijetlu biomase (Hames, 2009; Sluiter i ser., 2013). Budući da je u ovom radu kao sirovina korištena pšenična slama, detaljan sastav pšenične slame prikazan je u Tablici 1 (Boe i sur., 2007).

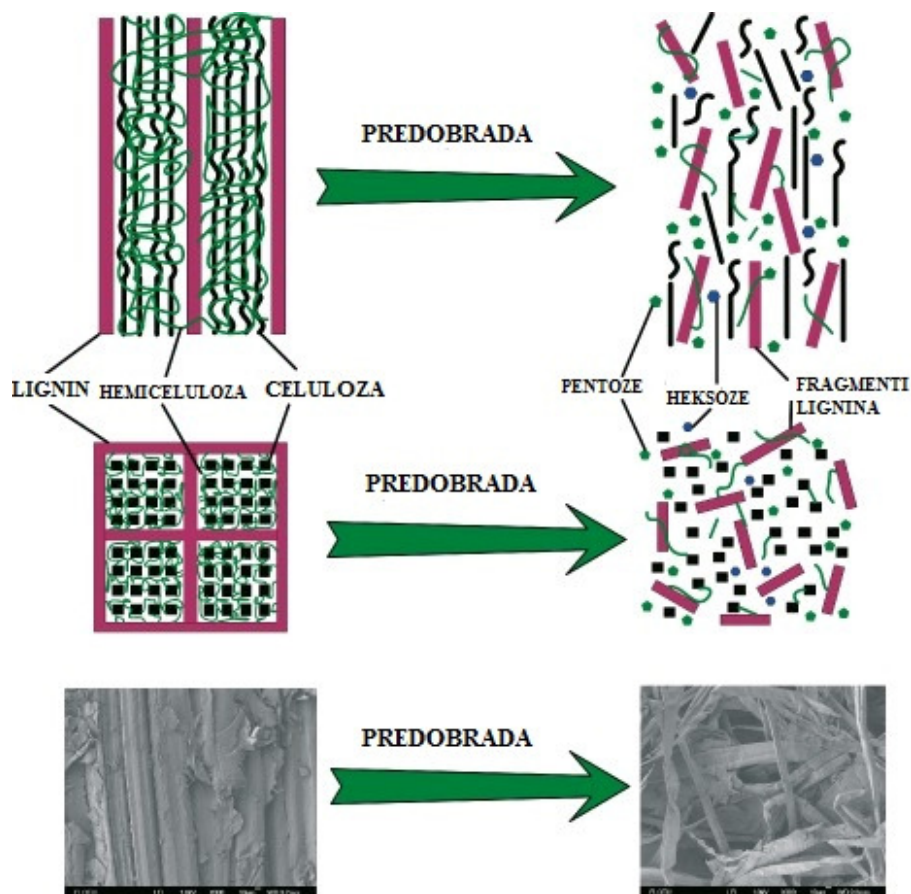
Tablica 1. Detaljan sastav pšenične slame prema Boe i sur. (2007.).

Komponenta	Udio (%) [w/w]
glukan	37,5
ksilan	21,7
arabinan	2,7
galaktan	1,6
manan	0,6
lignin topiv u kiselini	2,9
lignin netopiv u kiselini	16,4
proteini	4,7
pepeo	6,3

2.2. PREDOBRAĐA LIGNOCELULOZNE BIOMASE

Lignocelulozna biomasa je vrlo otporna na mikrobiološku razgradnju, a to ovisi o količini prisutnog lignina, stupnju kristalizacije, polimerizacije te o polisaharidima koji se nalaze na površini. Predobrada lignoceluloznih sirovina je ključna za postizanje učinkovite hidrolize sirovine. Troškovi predobrade su visoki, ali bez toga bi ukupan proces bio još skuplji. Glavni je cilj predobrade ukloniti hemicelulozu i/ili lignin, povećati dodirnu površinu te smanjiti kristaličnu strukturu celuloze. Predobrada je proces kojim se lignocelulozna

biomasa prevodi iz prirodnog oblika, nepristupačnog celulazama, u oblik na kojem je moguća enzimska hidroliza (Slika 4.; Ashok, 2009.).



Slika 4. Shematski prikaz djelovanja procesa predobrade (Anonymous 1).

Procesi predobrade koji se provode prije enzimске hidrolize mogu se podijeliti na: fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke postupke predobrade. Željeni učinci predobrade su:

- poboljšati djelovanje enzima
- svesti na minimum gubitak fermentabilnih šećera
- povećati proizvodnju drugih vrijednih nusprodukata
- ne upotrebljavati kemijska sredstva koja narušavaju enzimsku aktivnost ili su toksična za radni mikroorganizam
- smanjiti uporabu kemikalija, energije i kapitalne opreme
- mogućnost prijenosa u industrijsko mjerilo.

Odabirom metode predobrade se generalno nastoji ukloniti lignin, smanjiti kristaličnost celuloze, povećati poroznost sirovine, povisiti mogućnost nastanka šećera hidrolizom sirovine, izbjeći gubitak ugljikohidrata i nastanak inhibitora uslijed razgradnje (Barrett i sur., 2009).

Najupotrebljivnije fizikalne metode predobrade su mehaničko usitnjavanje (drobljenje i mljevenje), zračenje (UV, gama zrake, ultrazvuk), piroliza, tretman parom i SO₂, ekstruzija te ekspanzija (Ashok, 2009; Barrett, 2009). Ovim metodama predobrade omogućuje se povećanje kontaktne površine i pora lignoceluloznih sirovina za dostupnost enzima, smanjuje se stupanj polimerizacije te se smanjuje kristaličnost celuloze, i na kraju, omogućena je djelomična ili potpuna hidroliza hemiceluloze (Bajpai, 2016). Glavni nedostaci ove metode predobrade lignoceluloznih sirovina su visoka cijena postupka, visoki utrošak energije te slabije izdvajanje lignina u usporedbi s drugim metodama predobrade (Mousdale, 2008; Ashok, 2009; Barrett i sur., 2009).

Kemijske metode podrazumijevaju upotrebu lužina, koncentriranih ili razrijeđenih kiselina, ionskih tekućina i organskih kiselina, te ozonolizu. Od lužina najefikasnije su natrijev hidroksid i amonijak, kiseline koje su u upotrebi su sumporna, fosforna, klorovodična i dušična, te se mogu upotrijebiti vodikov peroksid, ozon ili kisik za oksidativnu delignifikaciju (Han i sur., 2009). Kemijskim metodama predobrade također se povećava kontaktna površina i pore lignocelulozne sirovine, smanjuje se stupanj polimerizacije, djelomična ili potpuna hidroliza hemiceluloze te se efektivno uklanja lignin. Prednosti ove metode osim toga su i visoka efikasnost procesa te se postiže vrlo uspješna razgradnja lignocelulozne sirovine (Ashok, 2009). Dok se kao glavni nedostaci upotrebe agresivnih kemikalija javljaju visoka cijena procesa zbog zahtjeva za korištenjem otporne procesne opreme, zbrinjavanje upotrijebljenih kemikalija i potreba za neutralizacijom sirovine nakon ovakve predobrade (Rezić, 2012).

Fizikalno-kemijske metode zahtijevaju upotrebu amonijaka, eksploziju vodenom parom ili ugljikovim dioksidom, tretman vrućom vodom ili mogu biti kombinacija gore navedenih fizikalnih i kemijskih metoda (primjerice eksplozija vodenom parom uz dodatak kiseline kao katalizatora razgradnje). Ako se ova metoda provodi bez upotrebe kemikalija, najvažnije prednosti su niži energetske troškovi, minimalna nužna upotreba kemikalija, nema zahtjeva za zbrinjavanjem kemikalija i zahtjeva za posebnom procesnom opremom. Ovom metodom se ne postiže zadovoljavajući postotak uklanjanja lignina, naročito ako je upotrebljena sirovina s povećanim udjelom lignina, ne postiže se potpuna hidroliza hemiceluloze te se dobiva manji udio glukoze nakon predobrade (Bajpai, 2016; Barrett i sur., 2009).

Biološka se metoda predobrade temelji na upotrebi enzima i mikroorganizama (fungi i bakterije) za hidrolizu lignocelulozne sirovine čime se postiže delignifikacija, smanjenje stupnja polimerizacije i hidroliza celuloze. Industrijski enzimi poput celulaza i ksilanaza ili lignolitičkih enzima (lakaza, lignin i manganaza peroksidaza) se koriste za razgradnju komponenti lignoceluloze, uključujući i lignin (Lopez i sur., 2007). Od mikroorganizama za ovaj proces bitne su gljive bijele tuleži (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Cyathus stercoreus*), koje uglavnom razgrađuju celulozu, zatim plijesni (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus awamori*, *Trichoderma viride*) i saprofitne gljive (*Pleurotus ostreatus*, *Phlebia subserialis*, *Ceriporia lacerata*) koje razgrađuju lignin i hidroliziraju hemicelulozu. Od bakterija se koriste *Zymomonas mobilis* i bakterije iz porodice *Lactobacillaceae* (Sun i Cheng, 2002; Saritha i Arora, 2012). Ovi su postupci ekološki i ekonomski prihvatljivi, nema upotrebe agresivnih kemikalija, blagi su uvjeti procesa u odnosu na ostale metode predobrade. Budući da se radi o živim organizmima, ovi su postupci vrlo spori, te se postiže manja efiksnost hidrolize, što su glavni nedostaci ove metode predobrade (Sun i Cheng, 2002; Saritha i Arora, 2012).

Predobrada je vrlo važan korak u razgradnji lignocelulozne sirovine. Ukoliko postupak predobrade nije dovoljno učinkovit, celulozu, zaostalu u lignoceluloznoj sirovini, teško je prevesti u fermentabilne ugljikohidrate enzimskom hidrolizom. Ako se predobrada lignoceluloznih sirovina provodi pri visokim temperaturama i tlaku uz korištenje kiseline ili lužine sa relativno visokim koncentracijama, mogu nastati različiti toksični spojevi. Ti spojevi mogu inhibirati celulolitičke enzime, kao i rast i aktivnost radnog mikroorganizma. Također, predobrada utječe na produktivnost bioprocasa, troškove izdvajanja i pročišćavanja proizvoda (Abdel-Rahman i sur., 2011).

2.2.1. Predobrada lignoceluloznih sirovina lužinama

Predobrada lignoceluloznih sirovina još uvijek predstavlja jednu od najskupljih operacija u procesu proizvodnje mliječne kiseline i drugih biokemikalija iz lignoceluloze. Ovim postupkom mijenja se struktura lignoceluloze i liziraju se kemijske veze koje povezuju lignin, hemicelulozu i celulozu te se odvajaju nastale frakcije lignina, hemiceluloze i celuloze. (Bajpai, 2013).

Alkalna predobrada je postupak koji se intenzivno istražuje te za ovaj način predobrade koristi različite lužine kao natrijev hidroksid, kalcijev hidroksid, kalijev hidroksid, amonijev

hidroksid te natrijev hidroksid u kombinaciji s vodikovim peroksidom (Chen i sur., 2013; Saritha i Arora, 2012). Općenito, alkalna predobrada je učinkovitija na lignoceluloznim sirovinama koje imaju niži udio lignina (npr. tvrdo drvo, travasti usjevi i poljoprivredni ostaci; Chen i sur., 2013). Alkalnom predobradom značajno se smanjuje udio lignina u sirovini, uklanja se hemiceluloza i uništava se kristalična struktura celuloze i na taj način olakšava enzimsku hidrolizu (Saritha i Arora, 2012). Kritični parametri pri provođenju predobrade lužinom su temperatura procesa, vrijeme zadržavanja te koncentracija uporabljene lužine, a osim toga uspješnost alkalne predobrade ovisi i o kemijskom sastavu i fizikalnoj strukturi tretirane lignocelulozne sirovine (Silverstein i sur., 2008).

Kemijski postupak alkalne hidrolize obuhvaća podvrgavanje lignocelulozne sirovine tlaku i temperaturi prilikom koje dolazi do hidrolize hemiceluloze i celuloze na jednostavne ugljikohidrate pri čemu je potrebno postići velike prinose ugljikohidrata (VonSivers i Zacchi, 1994). Predtretman lužinom se može voditi pri nižim temperaturama i tlakovima u odnosu na druge postupke, ali pri dužim vremenima zadržavanja. Osim što se ovim procesom postiže učinkovito uklanjanje lignina, procesom se uklanjaju i skupine acetilnih i uronskih kiselina na hemicelulozi pri čemu se povećava dostupnost hemiceluloze djelovanju enzima prilikom provedbe enzimske hidrolize (Barrett i sur., 2009).

Predtretman se može izvoditi ili pri visokim temperaturama i niskoj koncentraciji lužine (hidroliza razrijeđenom lužinom) ili pri niskim temperaturama i visokoj koncentraciji lužine (hidroliza koncentriranom lužinom) (Taherzadeh, 2007). Hidroliza razrijeđenom lužinom je uspješno razvijena za predobradu lignoceluloznih sirovina. Koriste se 0,5 - 2 %-tne lužine u temperaturnom intervalu od 121 °C do 210 °C. Uspoređujući s predtretmanom koncentriranim kiselinama i lužinama, ovaj postupak daje manje inhibitora koji nastaju razgradnjom ugljikohidrata. Prepreke u postizanju isplativosti procesa su visoka cijena lužine i mogućnost reciklacije lužine, korištenje opreme otporne na djelovanje lužina ili kiselina koje se koriste za neutralizaciju dobivenih hidrolizata što ih čini ekonomski neisplativima u odnosu na fizikalno-kemijske (Rezić, 2012). Glavni nedostatak predtretmana lužinama je mogućnost pojave reakcija saponifikacije baza i intermolekularnih esterskih prstenova dobivenih razgradnjom veza u ksilanima i drugim komponentama (Sun i Cheng, 2002).

2.2.2. Nastanak inhibitora tijekom procesa predobrade lignoceluloznih sirovina

Uvjeti predobrade lignoceluloznih sirovina podešavaju se tako da se ukloni što više hemiceluloze i lignina, te da se postigne visok stupanj razgradnje celuloze enzimima. S visokim stupnjem topivosti i razgradnje hemiceluloze (manjim dijelom i celuloze) i lignina dolazi do daljnje degradacije ovih produkata pod utjecajem ekstremnih uvjeta u kojima se vodi proces predobrade (Jönsson i Martín, 2015). Količina i svojstva nastalih spojeva, od kojih mnogi imaju inhibitorni učinak na aktivnost enzima i radni mikroorganizam ovisi o odabranoj metodi, uvjetima predobrade, kao i sastavu lignocelulozne sirovine (Jönsson i Martín, 2015; Olsson i Hahn–Hägerdal, 1996; Jiang i sur., 2016). Posljedica toga je smanjena učinkovitost enzimske hidrolize i biotehnoloških procesa proizvodnje različitih biokemikalija koji se provode na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u odnosu na procese koji se provode na hidrolizatima škroba i na jednostavnim ugljikohidratima (Palmqvist i Hahn–Hägerdal, 2000a).

Tijekom kiselinske predobrade lignoceluloznih sirovina, iz hemiceluloze nastaju pentoze i uronske kiseline koje se dehidriraju do 2-furaldehida (furfural), heksoze do 5-hidroksimetil-2-furaldehida (hidroksimetilfurfurala). Zbog visokih temperatura i dugog vremena zadržavanja, HMF se dalje degradira do levulinske i mravlje kiseline, a furfural do mravlje kiseline. Octena kiselina nastaje zbog hidrolize acetilnih grupa hemiceluloze tijekom kiselinske hidrolize (Jönsson i Martín, 2015). Fenolni spojevi uglavnom nastaju iz lignina tijekom hidrolize lignocelulozne sirovine (Jiang i sur., 2016). Fenolni spojevi s niskom molekulskom masom imaju veći inhibitorni učinak od hidroksimetilfurfurala, ali zbog malih koncentracija u hidrolizatu, teško je precizno odrediti utjecaj ovih spojeva na radni mikroorganizam (Jiang i sur., 2016).

Tijekom alkalne predobrade lignoceluloznih sirovina dolazi do manjeg stupnja razgradnje ugljikohidrata u odnosu na procese provedene tijekom predobrade kiselinama. Tako tijekom alkalne predobrade dolazi do nastajanja karboksilnih kiselina, mliječne i mravlje kiseline, kao i različitih dihidroksi i dikarboksilnih kiselina, te razgradnje polisaharida do sahariniskih kiselina. Octena kiselina nastaje saponifikacijom acetilnih grupa hemiceluloze. Nadalje, nastaju i različiti fenolni spojevi koji se mogu oksidirati do karboksilnih kiselina (Jönsson i Martín, 2015).

Razvijene su različite fizikalne, kemijske i biološke metode uklanjanja inhibitora iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina (Jiang i sur., 2016). Metode koje su razvijene u tu svrhu

su enzimski predtretman i predtretman lužinama (NaOH ili Ca₂OH), ion-izmjenjivačka i „ion exclusion“ kromatografija, dodatak aktivnog ugljena ili upotreba molekularnih sita. Također se mogu upotrijebiti i organska otapala za provođenje ekstrakcije (npr. etil acetat i superkritična otopina CO₂) ili filamentozne gljive poput *Trichoderme reesei*. Svi navedeni postupci smanjuju ekonomsku isplativost povećavajući cijenu i kompleksnost bioprocesa (Jonsson i sur., 2013).

2.3. ENZIMSKA HIDROLIZA PREDOBRAĐENIH LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

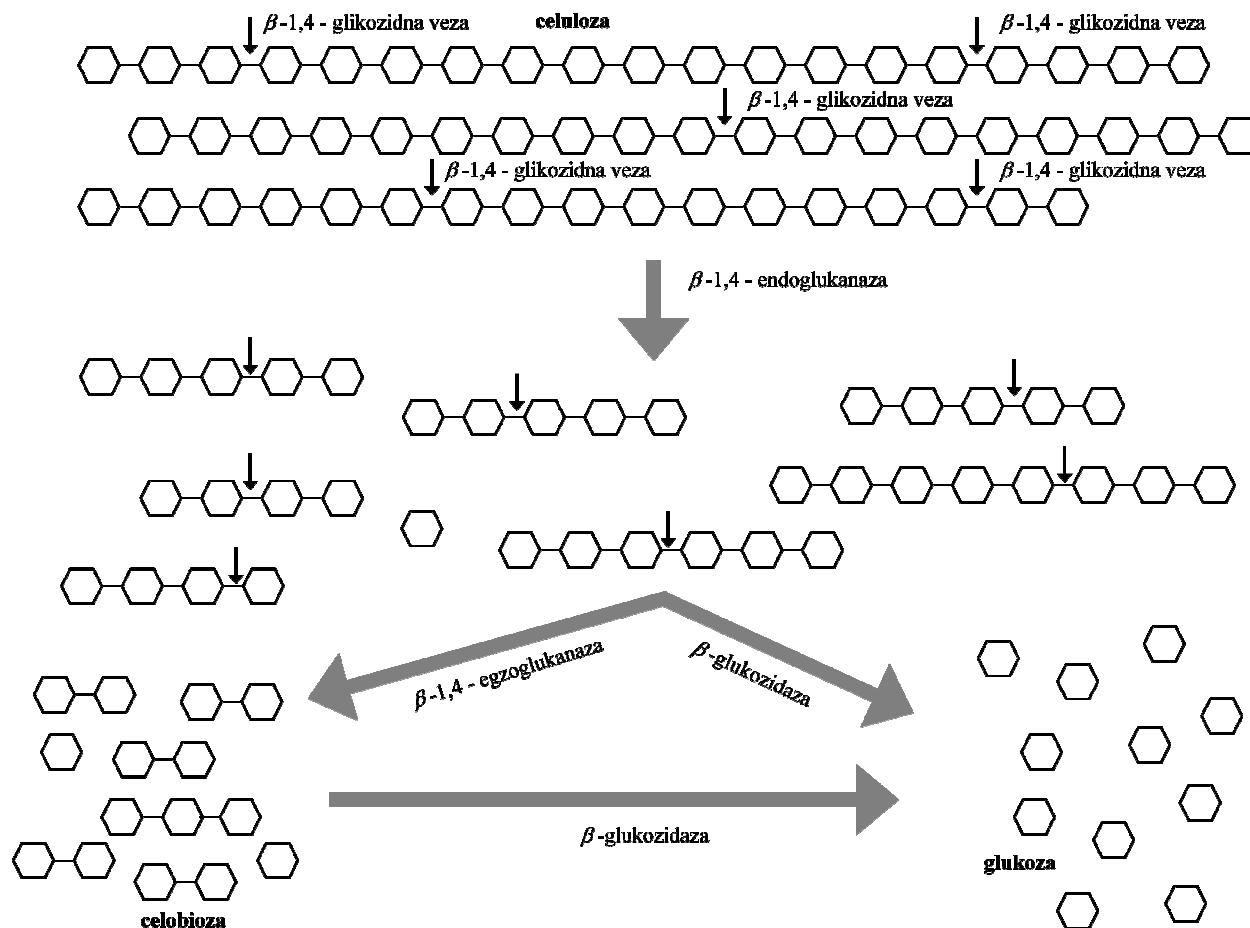
Enzimi su kompleksne polimerne strukture koje se sastoje od lanaca aminokiselina, koji lignoceluloznu sirovinu hidroliziraju veoma sporo zbog njene složene strukture. Enzimska hidroliza lignocelulozne sirovine je složen proces i odvija se u dvofaznom sustavu čvrsto-tekuće kroz tri simultana procesa (Sun i Cheng, 2002; Demirbas, 2005):

1. fizička i kemijska promjena čvrste faze celuloze bez otvaranja strukture
2. primarna hidroliza tijekom koje dolazi do otvaranja strukture i izdvajanja međuproizvoda s površine molekula celuloze koje su stupile u reakciju
3. sekundarna hidroliza tijekom koje dolazi do hidrolize unutarmolekularnih intermedijera u manje molekule koje dalje hidroliziraju do glukoze.

Enzimska hidroliza celuloze provodi se pomoću enzima celulaza (izoliranih iz bakterija, gljiva i prijesni) i mikroorganizama koji su aktivni u aerobnim, anaerobnim i termofilnim uvjetima. Celulaze predstavljaju skupinu enzima koja se sastoji od nekoliko različitih enzima s obzirom na produkte koji nastaju hidrolizom. Najpoznatiji predstavnici celulaza su tri grupe enzima koji sudjeluju u hidrolizi (Slika 5.), a to su:

1. endoglukonaza (endo-1,4- β -glukonaza, EG; EC 3.2.1.4) koja hidrolizira celulozna vlakna s manjim stupnjem kristalične strukture cijepajući veze i oslobađajući slobodne lance celuloze
2. egzoglukanaza ili celobiohidrolaza (CBH; EC 3.2.1.91) koja hidrolizira β -1,4-glikozidnu vezu na nereducirajućim krajevima celuloze i celooligosaharida pri čemu se oslobađa celobioza

3. β -glukozidaza (EC 3.2.1.74) čija je funkcija hidroliza β -1,4-glikozidne veze u celooligosaharidima i celobiozi i pritom otpuštajući molekulu glukoze s nereducirajućeg kraja.



Slika 5. Shematski prikaz hidrolize celuloze i celooligosaharida s celulazama (prilagođeno iz Mussatto i Teixeira, 2010). Strelica označava mjesto hidrolize β -1,4-glikozidne veze.

Prednosti procesa enzimske hidrolize su blagi reakcijski uvjeti (pH 4 – 6, temperatura 45 – 50 °C), mogućnost dobivanja visokog prinosa šećera, kompatibilnost s mnogim postupcima predobrade sirovine te niži investicijski troškovi za postrojenje u odnosu na postrojenja za kiselu ili lužnatu hidrolizu jer je smanjena korozija opreme pod utjecajem kiselina ili lužina.

2.3.1. Inhibicija celulolitičkih enzima

Katalitička aktivnost celulolitičkih enzima može biti inhibirana vezanjem za sastojke čvrstog dijela kao što su lignini i nerazgrađena hemiceluloza. Pozitivni učinak na enzimsku hidrolizu celuloze može imati dodatak albumina iz seruma goveda kako bi se spriječilo vezanje celulaza za lignin. Do inhibicije celulaze dolazi i zbog topivih ugljikohidrata (npr. oligosaharida iz ksilana i manana) i aromatskih spojeva prisutnih u hidrolizatu nakon predobrade. Nadalje, inhibicija produktom, glukozom ili celobiozom, je već poznati problem (Jönsson i Martín, 2015).

2.4. PROIZVODNJA MLIJEČNE KISELINE IZ LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Mliječna kiselina ili 2-hidroksipropanska kiselina, kemijske formule $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$, je organska kiselina koja postoji u dva stereoizomerna oblika, L-(+)-mliječna kiselina i D-(-)-mliječna kiselina. Ova kiselina je teško hlapiva, bezbojna ili blijedožute boje, higroskopna, viskozna tekućina bez mirisa. Pri visokim koncentracijama ova kiselina spontano polimerizira (Varadarajan i Miller, 1999). Mikrobnom fermentacijom mogu se dobiti čista L-(+)- i čista D-(-)-mliječna kiselina, ali i recemična smjesa ovih dvaju stereoizomera, dok se kemijskom sintezom dobiva isključivo recemična smjesa D-(-)- i L-(+)-mliječne kiseline (John i sur., 2007). Mliječna kiselina ima GRAS status (eng. *Generally Recognized As Safe*) pa se u značajnim količinama proizvodi za prehrambene svrhe, osim toga mliječne kiseline se primjenjuje u farmaceutskoj, kozmetičkoj i tekstilnoj industriji kao i za proizvodnju biopolimera (Abdel-Rahman i sur., 2011).

Gotovo sva mliječna kiselina se u novije vrijeme proizvodi mikrobnim procesom, odnosno fermentacijom supstrata dobivenih iz obnovljivih izvora pri relativno niskim temperaturama i uz mali utrošak energije. Mikrobnim se proces najčešće provodi na glukozu, saharozu, laktozu i različitim hidrolizatima (ječmeni slad, šećerna repa) kao supstratima, a sam proces provode bakterije mliječne kiseline (BMK) (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus*) ili plijesni (*Mucor*, *Monilia* i *Rhizopus*, od kojih je najpoznatiji *Rhizopus oryzae*) (John i sur., 2007). Biotehnološka proizvodnja mliječne kiseline iz lignoceluloznih sirovina podjeljena je na četiri faze:

1. predobrada – razgradnja lignocelulozne strukture

2. enzimaska hidroliza – prevođenje celuloze i hemiceluloze u fermentabilne ugljikohidrate (npr. glukozu, ksilozu, arabinozu)
3. fermentacija – biokonverzija dobivenih ugljikohidrata u mliječnu kiselinu pomoću BMK
4. izdvajanje i pročišćavanje – dobivanje mliječne kiseline za komercijalne svrhe.

Za održivu industrijsku proizvodnju mliječne kiseline potrebno je pronaći lako dostupne i relativno jeftine sirovine, pa su se kao takve pokazale lignocelulozne sirovine koje se dobivaju kao nusproizvod ili otpadni proizvodi iz prehrambene i drvne industrije, različiti poljoprivredni ostaci i slično. Kako bi se ovakva sirovina mogla iskoristiti kao supstrat za proizvodnju mliječne kiseline, one se zbog svog kompleksnog sastava moraju predobraditi kako bi se oslobodili jednostavni, fermentabilni šećeri koje onda bakterije mliječne kiseline mogu metabolizirati, što poskupljuje cijeli proces industrijske proizvodnje mliječne kiseline. Glavni problemi koji sprječavaju uspješnu proizvodnju mliječne kiseline iz lignoceluloznih sirovina su otpornost sirovine i problemi s odabirom predobrade, visoka cijena enzima za hidrolizu i njihova inhibicija toksičnim spojevima, nastajanje nusproizvoda heterofermentacijom te katabolička represija izvorom ugljika uzrokovana heterogenim sastavom ugljikohidrata u hidrolizatu lignocelulozne sirovine (Abdel–Rahman i sur., 2011).

2.4.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine specifičnu skupinu srodnih bakterija koje rastu u anaerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima proizvodeći mliječnu kiselinu iz ugljikohidrata kao krajnji proizvod metabolizma. To su gram-pozitivne, nesporogene, mezofilne bakterije, kemoorganotrofi, katalaza-negativne, nemaju citokroma, ne sintetiziraju porfirine, te rastu samo na kompleksnim hranjivim podlogama (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010). Karakterizira ih GRAS status (eng. *Generally Recognized As Safe*). BMK obuhvaćaju 20 rodova: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Sporolactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Actinomyces* i *Atopobium*. Rod *Lactobacillus* s oko 80 vrsta je najbrojniji, a svi spomenuti rodovi izuzev roda *Bifidobacterium* imaju niski G+C (gvanin + citozin) sadržaj (< 50%) (Schleifer i sur., 1995).

Bakterije mliječne kiseline energiju dobivaju fermentacijom ugljikohidrata, a većina saharida i oligosaharida transportira se u stanicu pomoću specifičnih permeaza te se fosforiliraju unutar stanice pomoću ATP-ovisnih kinaza. Za razgradnju heksoza, bakterije mliječne kiseline koriste glikolizu ili Embden-Meyerhof-Parnasov put i 6-fosfoglukonat/fosfoketolazni put. S obzirom na način kojim fermentiraju heksoze, bakterije mliječne kiseline se dijele u tri grupe: obligatno homofermentativne bakterije, obligatno heterofermentativne bakterije i fakultativno heterofermentativne bakterije (Šušković, 1996). Kod obligatno homofermentativnih bakterija kao krajnji produkt razgradnje glukoze nastaje isključivo mliječna kiselina pri čemu po molu glukoze nastaje mol laktata. Kod obligatno heterofermentativnih bakterija razgradnjom glukoze osim mliječne kiseline nastaju i drugi produkti, poput CO₂, octene kiseline ili etanola. Homofermentativne bakterije proizvode duplo više energije nego heterofermentativne. Fakultativno heterofermentativne bakterije posjeduju oba navedena puta i fermentiraju glikolizom glukozu do laktata, a u uvjetima limitacije glukoze 6-fosfoglukonatnim putem do navedenih produkata (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010; Slavica i sur., 2015).

Bakterije mliječne kiseline mogu rasti na širokom rasponu temperatura od 5 – 45 °C i pri optimalnoj pH vrijednosti između 5,5 – 6,5 jedinica, pri čemu se mogu postići visoke brzine rasta, visoki prinos i specifičnost produkta (Özcelik i sur., 2016; Trontel i sur., 2010). Bakterije mliječne kiseline proizvode različite spojeve kao što su organske kiseline (mliječna, octena, propionska), diacetil, vodikov peroksid i bakteriocine ili bakteriocidalne proteine tijekom mliječne fermentacije, koje uzrokuju antimikrobni učinak što je bitno za industriju fermentiranja hrane i konzerviranja hrane i pića (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010).

2.4.1.1. Rod *Lactobacillus*

Prema klasičnim fenotipskim testovima, bakterije roda *Lactobacillus* podijeljene su u tri osnovne skupine prema heksoza-fermentativnom putu: homofermentativne, fakultativno heterofermentativne i obligatno heterofermentativne. Suvremene molekularne metode donijele su i novu podjelu *Lactobacillus* vrsta koja može razlikovati fenotipski vrlo slične, ali genotipski bitno različite bakterijske vrste (Vandamme i sur., 1996). Do sada je prepoznato 56 vrsta iz roda *Lactobacillus*, od kojih 5 imaju i podvrste. Najpoznatije vrste iz roda *Lactobacillus* su *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. plantarum* i *L. delbrueckii* (Tannock,

1983). Identifikacija bakterijskih vrsta i podjela u skupine provedena je nakon sekvencioniranja 16S rRNA gena (rDNA) pomoću specifičnih oligonukleotidnih proba PCR metodom (eng. *Polymerase Chain Reaction*). Velike promjene u sistematici bakterija posljedica su spoznaje da su sekvencije 16S rRNA „evolucijski kronometar“. Neke su regije unutar molekule 16S rRNA konzervirane odnosno jednake u svim bakterijskim vrstama, dok se ostali dijelovi molekule razlikuju u sekvencijama nukleinskih baza i mogu se međusobno uspoređivati (Neefs i sur., 1993).

2.4.1.1.1. *Lactobacillus amylovorus*

Lactobacillus amylovorus je bakterija štapićastog oblika koja formira kratke lance, fakultativno je anaerobna, nesporogena, katalaza i oksidaza negativna te Gram-pozitivna bakterija. Proizvodi velike količine mliječne kiseline te u određenim uvjetima male količine octene kiseline, pri tome ne stvarajući plin iz glukoze. Zahtijeva kompleksnu hranjivu podlogu u koju je potrebno dodati faktore rasta: vitamine, riboflavin, nikotinsku, folnu i pantotensku kiselinu, neophodne za rast ove bakterije, dok tiamin nije potreban. Optimalna temperatura za rast i metabolizam ove bakterije je 37 – 45 °C, minimalna temperatura pri kojoj može rasti je 20 – 25 °C, a maksimalna 45 – 50 °C. Također ima sposobnost metabolizirati škrob te proizvodi izvanstanični amilolitički enzim (Nakamura, 1981).

Bakterija *L. amylovorus* ubraja se u rod *Lactobacillus*, obitelj *Lactobacillaceae*, red *Lactobacillales*, razred *Bacilli*, te pripada skupini obligatno homofermentativnih bakterija mliječne kiseline, pri čemu ima sposobnost metabolizirati različite supstrate poput škroba, glukoze, celobioze, manoze, galaktoze, maltoze, saharoze, trehaloze i fruktoze (Hammes i Hertel, 2009). Ova industrijski primjenjiva bakterija može sintetizirati oba stereoizomera mliječne kiseline, D- i L-laktat i to u različitim omjerima. Omjer proizvedenih stereoizomera može se podešavati primjenom različitih izvora ugljika i održavanjem različitih temperatura procesa (Trontel i sur., 2010). Pri određenim uvjetima ova obligatno homofermentativna bakterija ima sposobnost proizvodnje acetata uz laktat, te je tada acetat drugi krajnji proizvod razgradnje ugljikohidrata (Slavica i sur., 2015). Iako amilolitičke bakterije mliječne kiseline, u koje se ubraja i *L. amylovorus*, mogu metabolizirati širok raspon različitih supstrata, ne mogu metabolizirati sve mono- i disaharide prisutne u obnovljivim i otpadnim materijalima, pa tako *L. amylovorus* ne može metabolizirati pentoze, laktozu, rafinozu i melibiozu.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovina

Lignocelulozna sirovina korištena u ovom radu bila je pšenična slama (w(suhe tvari) = 92,8%) podrijetlom iz Hrvatskog Zagorja (Slika 6.). Sirovina je usitnjena na mlinu čekičaru sa sitom veličine 5 mm (mlin čekičar – tip NA45; Megametal d.o.o., Nedelišće, Hrvatska) te je korištena u procesu predobrade u visokotlačnom reaktoru (poglavlje 3.2.1.). Za analizu je uzeto 500g suhe tvari sirovine.



Slika 6. Pšenična slama usitnjena mlinom čekičarom.

3.1.2. Enzimi

U ovom radu korišteni su slijedeći enzimi za hidrolizu predobrađenih lignoceluloznih sirovina:

- (1) Celulaze iz *Aspergillus niger* (1,4-(1,3:1,4)- β -D-glukan-4-glukanohidrolaza; EC 3.2.1.4.; aktivnost 1,70 U/mg; Sigma, Njemačka).
- (2) Glukozidaza (celobiaz) iz *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.21; aktivnost 1040 U/g; Sigma, Njemačka).

3.1.3. Mikroorganizam

U ovom radu, kao radni mikroorganizam, korištena je bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T iz zbirke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Njemačka).

3.1.4. Kemikalije i hranjive podloge**Tablica 2.** Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripremu hranjivih podloga i otopina.

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
natrijeva lužina	p.a.	Kemika, Hrvatska
amonijev citrat	p.a.	Merck, Njemačka
D-(+)-ksiloza	≥99 %, za biokemiju	Roth, Njemačka
L-(+)-arabinoza	za mikrobiologiju	Kemika, Hrvatska
D-(+)-glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
manganov sulfat monohidrat	p.a.	Merck, Njemačka
dikalijev hidrogenfosfat	p.a.	Merck, Njemačka
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
magnezijev sulfat	p.a.	Merck, Njemačka
mesni ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
natrijev acetat trihidrat	p.a.	Merck, Njemačka
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
Tween 80®	p.a.	Merck, Njemačka
sumporna kiselina	min. 96%, p.a.	Kemika, Hrvatska
celobioza	p.a.	Molekula, UK
etanol	p.a.	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
demineralizirana voda	p.a.	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
fosfatna kiselina	p.a., za HPLC	Fluka, Njemačka
kalcijev hidroksid	p.a.	Kemika, Hrvatska

3.1.4.1. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterijskih kultura

Čista kultura BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T čuvana je i održavana na čvrstoj i u tekućoj De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) hranjivoj podlozi, čiji je sastav prikazan u Tablici 3. (Biolife, Milano, Italija; De Man i sur., 1960). Ova hranjiva podloga korištena je i za pripremu inokuluma za uzgoj *L. amylovorus* na predobrađenoj pšeničnoj slami. Početne pH vrijednosti priređenih tekućih hranjivih MRS podloga iznosile su $6,2 \pm 0,2$ jedinica.

Tablica 3. Sastav čvrste De Man, Rogosa i Sharpe podloge.

Kemikalije	Koncentracija [g/L]
agar*	15
diamonijev citrat	2
dikalijev hidrogenfosfat	2
glukoza	20
kvašćev ekstrakt	5
magnezijev sulfat	0,05
manganov sulfat	0,2
mesni ekstrakt	10
natrijev acetat	5
pepton	10
Tween 80®	1 mL/L

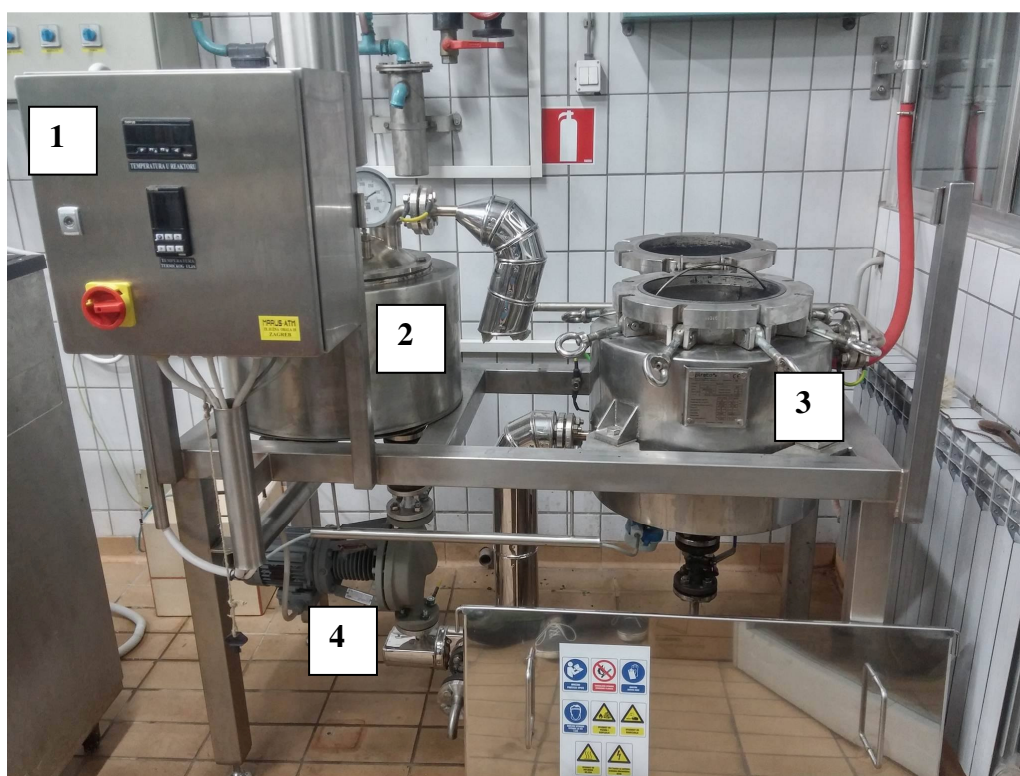
*tekuća MRS podloga ne sadrži agar.

3.2. APARATURA I PRIBOR

3.2.1. Uređaj za termičku predobradu lignoceluloznih sirovina

Pšenična slama (500 g suhe tvari) se stavlja u metalnu perforiranu košaru koja se nalazi u reaktoru zapremnine 20 litara, zatim se ulijeva 10 litara (L) natrijeve lužine ($w = 2,0 \%$ NaOH) i sadržaj se promiješa. Reaktor, prikazan na Slici 7., se zatvara i vijci se dobro zategnu kako ne bi došlo do isparavanja tekućine te se sustav uključuje na kontrolnoj jedinici [1] čime započinje grijanje spremnika koji sadrži termičko ulje [2]. Termičko ulje se grije sa tri grijača

snage 1,0 kW, a reaktor za predobradu sirovine [3] se grije vrućim termičkim uljem preko plašta. Uključivanjem sustava uključuje se i pumpa [4] koja omogućuje cirkulaciju termičkog ulja kroz cijeli sustav. Nadzor procesa se provodi mjerenjem temperature ulja, temperature tekućeg dijela i temperature pare nastale tijekom zagrijavanja i tlaka u reaktoru sa sirovinom. Kad se postignu zadani uvjeti temperature i tlaka pare u reaktoru, započinje se mjeriti vrijeme zadržavanja pri željenoj temperaturi. Nakon završetka procesa se pomoću ventila sa gornje strane uređaja, koji služi za otpuštanje pare, spušta tlak na atmosferski, tekući dio se ispušta otvaranjem ventila na dnu reaktora (ispust), a kruti dio zaostaje u perforiranoj posudi od nehrđajućeg čelika.



Slika 7. Visokotlačni reaktor ili uređaj za termičku predobradu lignocelulozne sirovine (1. kontrolna jedinica; 2. posuda sa termičkim uljem i grijačima; 3. reaktor za predobradu sirovine; 4. pumpa).

3.2.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

(eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)

Kromatograf Shimadzu CLASS-VP LC10AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan) sastoji se od pumpe (LC-10ADVP), otplinjača (DGU-14A), automatskog uzorkivača i injektora (SIL-10ADVP), uređaja za grijanje kolone (CTO-10AVP), ionsko-izmjenjivačke analitičke kolone (Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-19AVP) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).

3.2.3. Ostala oprema

- analitička vaga Shimadzu (Kyoto, Japan);
- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- autoklav Sutjeska;
- mikser EV-100, Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- pH metar 744, Metrohm (Herisau, Švicarska);
- sušionik Instrumetaria ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- magnetna mješalica Cimarec i™ Poly15 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- oprema za filtraciju otopina [najlonski filter (0,20μm, 47 mm; Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, SAD)]
- ultrazvučna kupelj USC300T (VWR International, Leuven, Belgija)
- UV/Vis spektrofotometar Cary 13E Varian (Mulgrave, Australija)
- staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka),
- centrifuga Harrier 18/10 (Sanyo, Watford, Velika Britanija)

3.3. METODE RADA

3.3.1. Određivanje sastava pšenične slame

Sastav pšenične slame i filter papira određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Priprema uzorka i postupak dvostupanjske kiselinske hidrolize opisan je u poglavlju 3.3.6.3. Sastav filter papira i pšenične slame korištene tijekom provedenih eksperimenata prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Sastav glavnih komponenti pšenične slame i filter papira određen dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom.

sirovina	w_{glukan} (%)	w_{ksilan} (%)	w_{arabijan} (%)	w_{LTK} (%)	$w_{\text{NNTLK+pepel}}$ (%)	w_{HAc} (%)
pšenična slama	48,39	25,18	4,3	0,26	15,65	2,11
filter papir	71,47	16,55	1,03	0,00	2,50	0,17

LTK - lignin topiv u kiselini; LNTK - lignin netopiv u kiselini

3.3.2. Alkalna predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru s natrijevom lužinom

Alkalna predobrada pšenične slame (PS) provedena je u visokotlačnom reaktoru pri uvjetima navedenim u Tablici 5. Prvo je provedena predobrada pri temperaturi od 210°C i različitim vremenima zadržavanja, a zatim su provedene predobrade pri konstantnom vremenu zadržavanja i različitim temperaturama (120 - 210°C). Odvagano je 500 grama (m_{LC}) suhe tvari usitnjene pšenične slame i stavljeno u reaktor za predobradu lignoceluloznih sirovina. U reaktor je dodano 10 L (V_0) otopine natrijeve lužine ($w = 2\%$). Nakon određenog vremena zadržavanja (t_z) i ispuštanja pare dobivene su dvije faze, tekuća faza i čvrsta faza lignocelulozne sirovine. Tekuća i čvrsta faza su odvojene i zasebno su analizirane kako je to opisano u poglavlju 3.3.6.6. Čvrsta faza je isprana sa destiliranom vodom do neutralne pH vrijednosti i nakon toga osušena u sušioniku pri 80°C. Takva čvrsta faza (predobrađena pšenična slama) korištena je za enzimsku hidrolizu i fermentaciju.

Tablica 5. Uvjeti u visokotlačnom reaktoru pri kojima je provedena predobrada pšenične slame.

m_{PS} (g)	t_{pare} (°C)	p_{pare} (bar)	t_Z (min)	V_0 (L)	w_{NaOH} (%)	Oznaka
500	210	20,0	20	10	2,0	PS/210 °C/2 % NaOH/20 min
500	210	20,0	20	10	2,0	PS/210 °C/2 % NaOH/10 min
500	210	20,0	20	10	2,0	PS/210 °C/2 % NaOH/1 min
500	120	1,0	20	10	2,0	PS/120 °C/2 % NaOH/20 min
500	160	5,0	20	10	2,0	PS/160 °C/2 % NaOH/20 min
500	180	8,5	20	10	2,0	PS/180 °C/2 % NaOH/20 min

*PS, pšenična slama (izražena kao suha tvar)

3.3.3. Enzimaska hidroliza predobrađene pšenične slame

Enzimaska hidroliza osušene i usitnjene predobrađene pšenične slame provedena je s komercijalnim celulazama iz *A. niger* (1,4-(1,3:1,4)- β -D-glukan-4-glukanohidrolaza; EC 3.2.1.4; aktivnost 1,7 U/mg; Sigma, Njemačka) i komercijalnom glukozidazom iz *A. niger* (celobiazaza; EC 3.2.1.21; aktivnost 1040 U/g; Sigma, Njemačka). Matične otopine enzima pripremljene su otapanjem pripravaka enzima u demineraliziranoj vodi. Nakon toga su otopine enzima profiltrirane kroz celuloza acetatni sterilni filter veličine pora 0,20 μ m (LLG-Syringe filters, CA, 0.20 μ m, promjer 25 mm, LLG Labware, SAD) u sterilnu kivetu i čuvane pri temperaturi od 4°C. Dodatak enzima u sterilizirane suspenzije predobrađene pšenične slame i svi postupci izuzimanja uzoraka provedeni su u sterilnim uvjetima.

Priprema suspenzije predobrađene pšenične slame za enzimsku hidrolizu provedena je na slijedeći način: u Erlenmeyer tikvicu odvagana je odgovarajuća količina (0,5g, 1g ili 2g) predobrađene usitnjene pšenične slame (PS/180°C/20min/2%NaOH) te je dodano 50 mL natrij acetatnog pufera ($c = 50$ mM). Tikvica je zatvorena vatenim čepom i sterilizirana u autoklavu tijekom 20 minuta. Nakon hlađenja na temperaturu hidrolize (40°C) dodan je odgovarajući volumen matične otopine enzima celulaza ($\gamma = 100$ mg/mL) i/ili β -glukozidaze ($\gamma = 20$ mg/mL).

Kako bi se optimirali uvjeti enzimske hidrolize predobrađene pšenične slame provedeni su eksperimenti u kojima je istražen utjecaj pH vrijednosti, omjer dodanog enzima (E) i supstrata (S) i koncentracija dodanog supstrata. Svi eksperimenti su provedeni pri temperaturi od 40°C (odgovara temperaturi uzgoja BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T) u 50 mM acetatnom puferu na magnetnoj mješalici uz brzinu okretaja od 150 min⁻¹ (Tablica 6.).

Tablica 6. Uvjeti pri kojima su provedene enzimske hidrolize predobrađene pšenične slame (PPS).

pH	w _{PPS}	E/S omjer celulaze	E/S omjer β -glukozidaze	V _{pufer}	T
(-)	(%)	mg _E /g _S	mg _E /g _S	(mL)	(°C)
5,5	1	2	-	50	40
5,5	1	10	-	50	40
5,5	1	20	-	50	40
5,5	1	20	-	50	40
5,5	2	20	-	50	40
5,5	4	20	-	50	40
4,0	1	20	-	50	40
4,5	1	20	-	50	40
5,0	1	20	-	50	40
5,5	1	20	-	50	40
6,0	1	20	-	50	40
5,0	1	20	2	50	40
5,0	1	20	4	50	40
5,0	1	20	8	50	40

3.3.4. Priprava hranjivih podloga

Bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T uzgajanje i čuvana u MRS podlozi (Biolife, Milano, Italija) koja se priprema otapanjem praškaste podloge u demineraliziranoj vodi prema uputama proizvođača. Sastav podloge naveden je u poglavlju 3.1.4.1.

Eksperimentalni dio

Za uzgoj inokuluma za provođenje fermentacija korištena je MRS podloga. Predobrađena pšenična slama ($w_{PS} = 2 \%$) dodana je u natrij-acetatni pufer (50 mM; pH 5,0) te je pripremljena suspenzija sterilizirana u autoklavu pri 121°C tijekom 20 minuta. U zasebnoj tikvici sterilizirana je otopina kvašćevog ekstrakta ($\gamma_{KE} = 50 \text{ g/L}$) i peptona ($\gamma_{PEPTON} = 50 \text{ g/L}$) pri istim uvjetima. Ovako pripravljene suspenzije/otopine korištene su za pripravu podloga za uzgoj.

Bakterijska kultura *L. amylovorus* DSM 20531^T uzgajana je u podlogama koje se sastoje od:

(1) hidrolizat predobrađene pšenične slame (PS/180 °C/2 % NaOH/20 min) tretiran celulazama (E/S omjer 20 %) u koje je dodan kvašćev ekstrakt (5 g L⁻¹) i pepton (5 g L⁻¹)

(2) hidrolizat predobrađene pšenične slame (PS/180 °C/2 % NaOH/20 min) tretiran celulazama (E/S omjer 20%) i β -glukozidazom (E/S omjer 2 %) u koje je dodan kvašćev ekstrakt (5 g L⁻¹) i pepton (5 g L⁻¹)

(3) predobrađena pšenična slama (PS/180 °C/2 % NaOH/20 min) u koje je dodan kvašćev ekstrakt (5 g L⁻¹), pepton (5 g L⁻¹) i celulaze (E/S omjer 20 %) na početku fermentacije

(4) predobrađena pšenična slama (PS/180 °C/2 % NaOH/20 min) u koje je dodan kvašćev ekstrakt (5 g L⁻¹), pepton (5 g L⁻¹), celulaze (E/S omjer 20 %) i β -glukozidaza (E/S omjer 2 %) na početku fermentacije.

Podloge prikazane na Slici 8. pod oznakom (1) i (2) su nakon provedene hidrolize koja je trajala 72 h pri 40°C i broju okretaja miješala od 150 min⁻¹, a prije inokulacije s radnom kulturom, prokuhane tijekom 20 minuta u kipućoj vodi kako bi se inaktivirali enzimi.



Slika 8. Prikaz podloga koje se sastoje od predobrađene pšenične slame (PS/180 °C/2 % NaOH/20 min) te kvašćevog ekstrakta i peptona.

3.3.5. Uzgoj bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnja mliječne kiseline na predobrađenoj pšeničnoj slami

Provedena su dva tipa bioprocasa proizvodnje mliječne kiseline s pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T :

(i) odvojena hidroliza predobrađene pšenične slame i fermentacija ugljikohidrata do mliječne kiseline (podloga (1) i (2), poglavlje 3.2.3.) – *f*-tip

(ii) simultana hidroliza predobrađene pšenične slame i fermentacija ugljikohidrata do mliječne kiseline (podloga (3) i (4), poglavlje 3.2.3.). –*SHF* (eng. *simultaneous hydrolysis and fermentation*) tip

Korisni volumen podloge iznosio je 300 mL. Uzgoj je proveden pri 40°C na magnetnoj mješalici ($n = 150 \text{ min}^{-1}$) bez podešavanja pH vrijednosti. Sve podloge nacijepljene su svježom, preko noći, poraslom kulturom *L. amylovorus* DSM 20531^T (2,5 % vol/vol ; $V = 7,5 \text{ mL}$) u hranjivoj MRS podlozi (16 h/40°C).

Tijekom ovih uzgoja u aseptičnim uvjetima izuzimani su uzorci u pravilnim vremenskim intervalima kako bi se odredila kinetika rasta bakterije i fermentacija jednostavnih ugljikohidrata, dobivenih enzimskom hidrolizom, do mliječne kiseline.

3.3.6. Analitičke metode

U ovom poglavlju opisane su metode za određivanje uspješnosti alkalne predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru i sastava tekuće i čvrste faze (predobrađene pšenične slame), metode koje su korištene za praćenje uspješnosti hidrolize predobrađene pšenične slame celulazama kao i metode za praćenje bioprocasa proizvodnje mliječne kiseline s pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T.

Tako je tijekom alkalne predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru bilo potrebno odrediti masu čvrste faze (predobrađene pšenične slame) dobivene nakon predobrade (poglavljje 3.3.6.1.), odrediti udio topljivog lignina (poglavljje 3.3.6.2.), udio netopljivog lignina i pepela (poglavljje 3.3.6.3.), koncentraciju furana (poglavljje 3.3.6.5.), sastav čvrste i tekuće faze (poglavljje 3.3.6.7.).

Tijekom enzimske hidrolize predobrađene pšenične slame određivan je sastav ugljikohidrata HPLC metodom (poglavljje 3.3.6.7.4.), a tijekom bioprocasa proizvodnje mliječne kiseline s pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T (poglavljje 3.3.5.) praćena je optička gustoća izuzetih uzoraka (OD_{600}) (poglavljje 3.3.6.6.). Nakon izdvajanja biomase centrifugiranjem u supernatantima određena je i koncentracija: celobioze (γ_{cb}), glukoze (γ_{glc}), ksiloze (γ_{ksi}), arabinoze (γ_{arab}), mliječne kiseline (γ_{MK}) te octene kiseline (γ_{OK}), levulinske (γ_{LK}) i mravlje kiseline ($\gamma_{formijat}$) HPLC metodom (poglavljje 3.3.6.7.4.)

3.3.6.1. Određivanje udjela suhe tvari

Staklene petrijeve zdjelice (petrijevke) sušile su se u sušioniku 1 sat do konstantne mase, zatim su se hladile u eksikatoru najmanje desetak minuta i na kraju vagale na analitičkoj vagi. U njih je odvagano 25 g čvrste faze dobivene nakon predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru i stavljene su u sušionik na sušenje minimalno 24 h. Nakon sušenja, izvagana je masa petrijevke sa osušenom čvrstom fazom te udio suhe tvari (s.tv.) izračunat prema formuli:

$$w(s. tv.) = \frac{m(\text{petrijevke nakon sušenja}) - m(\text{prazne petrijevke})}{m(\text{odvaganog uzorka})} * 100 \quad [3-1]$$

3.3.6.2. Određivanje udjela lignina topljivog u kiselini

Određivanje topljivog lignina provedeno je u filtratu nakon dvostupanjske hidrolize čvrste faze mjerenjem apsorbancije spektrofotometrom pri valnoj duljini od 205 nm. Udio lignina topljivog u kiselini ($w(LTK)$) je izračunat pomoću formule:

$$w(LTK) = \frac{A \cdot D \cdot V}{a \cdot b \cdot m} * 100 \quad [3-2]$$

A - apsorbancija uzorka na 205 nm

D - faktor razrjeđenja

V - volumen filtrata

a – konstanta, 110 g/Lcm

m – masa uzorka uzetog u analizu (g)

3.3.6.3. Određivanje udjela netopivog lignina

Isprani čvrsti dio zaostao na filteru nakon kiselinske hidrolize je prebačen u prethodno osušenu i izvaganu petrijevu zdjelicu i osušen na temperaturi od 105 °C kroz 24 sata. Nakon sušenja, uzorak je ponovo izvagan te je određen netopivi udio lignina zaostao nakon kiselinske hidrolize. Udio netopivog lignina je izračunat prema slijedećoj formuli:

$$w(LNTK) = \frac{m(\text{osušeni filter s talogom}) - m(\text{filtera})}{m(\text{uzorka čvrste faze uzetog u analizu})} \quad [3-3]$$

3.3.6.4. Dvostupanjska kiselinska hidroliza

Ovom metodom analiziran je sastav samljevene sirovine i uzorci čvrste faze nakon predobrade slame u visokotlačnom reaktoru zbog određivanja koncentracije ugljikohidrata i lignina topivog i netopivog u kiselini. U tikvicu s okruglim dnom dodano je po 0,4 g uzorka i 4 mL 72 %-tne H_2SO_4 . Nakon jednog sata inkubacije na temperaturi od 30 °C, sirovini je dodano 112 mL demineralizirane vode tako da je koncentracija sulfatne kiseline iznosila 4 %.

Eksperimentalni dio

Uzorci su kuhani 4 sata uz povratno hladilo. Sadržaj u tikvici povremeno je miješan okretanjem tikvice kako bi se ostvario što bolji kontakt lignocelulozne sirovine i kiseline. Nakon kuhanja, uzorak je ohlađen pod mlazom vode, profiltriran kroz celulozni filter papir postavljen na Büchnerov lijevak. U zaostalom čvrstom dijelu sirovine na filter papiru određen je lignin netopljiv u kiselini, a u filtratu koncentracija glukoze, ksiloze, arabinoze, celobioze, levulinske kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline, furana i lignina topljivog u kiselini.

3.3.6.5. Određivanje furfurala spektrofotometrijski

Koncentracija furfurala je određivana u tekućoj fazi te u filtratu nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Za određivanje furfurala pomoću spektrofotometra je potreban baždarni pravac koji se prethodno napravi mjerenjem apsorbancija otopina furfurala poznatih koncentracija. Uzorak s nepoznatom koncentracijom furfurala se razrijeđuje demineraliziranom vodom u omjeru 1:1000 te se mjeri apsorbancija na 284 nm i 320 nm. Koncentracija se određuje iz jednadžbe baždarnog pravca ($\gamma_{\text{furfural}} = 2,496 \cdot \Delta A + 0,0158$; $R^2 = 0,998$).

3.3.6.6. Određivanje optičke gustoće uzoraka hranjive podloge

Izuzeti uzorci imali su visoku optičku gustoću ($A_{600} > 1,5$ AU), pa je bilo potrebno prirediti odgovarajuća razrijeđenja ovih uzoraka. Određeni volumen svakog razrijeđenja ($V \approx 4$ mL) prenesen je u kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) i pomoću UV/Vis spektrofotometra Cary 13E Varian (Mulgrave, Australija) određena je optička gustoća pri valnoj duljini (λ) od 600 nm (A_{600}).

3.3.6.7. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

3.3.6.7.1. Priprema uzoraka čvrste faze za analizu HPLC metodom

Dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom je dobiven filtrat koji je potom neutraliziran dodatkom $\text{Ca}(\text{OH})_2$ do pH vrijednosti od oko 5 - 6 jedinica. Uzorak je zatim centrifugiran (5000 g, 5 min; HC-240, Tehtnica, Železniki, Slovenija), a dobiveni supernatant je profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine 0,2 μm (33 mm; Carl Roth, GmbH & Co, Karlsruhe, Njemačka). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustava.

3.3.6.7.2. Priprema uzorka tekuće faze za analizu HPLC metodom

Volumenu od 700 μL neutraliziranog uzorka tekuće faze dodano je 700 μL 10 %-tne otopine cinkova sulfata heptahidrata. Uzorci su zatim snažno izmiješani tijekom 20-tak sekundi (mikser EV-100, Tehtnica, Železniki, Slovenija) i ostavljeni da odstoje 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Dobiveni talog izdvojen je centrifugiranjem (10000 g, 5 min; HC-240, Tehtnica, Železniki, Slovenija), a supernatant je profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine 0,2 μm (Cromafil®Xtra PA(NY)-20 μm /25mm; Machery-Nagel CoKG, Düren, Njemačka). Pripremljeni uzorci su analizirani pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustava (poglavlje 3.3.6.7.4.)

Iz uzoraka izuzetih tijekom uzgoja bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T centrifugiranjem (4500 g, 10 min, 4 °C, Harrier 18/10 Sanyo, Watford, Velika Britanija) je izdvojena biomasa. Iz dobivenih supernatanta taloženjem su izdvojeni proteini sa cinkovim sulfatom heptahidratom (poglavlje 3.3.6.7.3.) Dobivena otopina je profiltrirana pomoću šprica kroz najlonski filter sa porama veličine 0,20 μm (Cromafil®Xtra PA(NY)-20 μm /25mm; Machery-Nagel CoKG, Düren, Njemačka). Filtrat je analiziran pomoću kromatografskog sustava.

3.3.6.7.3. Taloženje proteina iz uzoraka cinkovim sulfatom

U supernatant uzorka volumena 700 μL dodana je otopina cinkovog sulfata heptahidrata ($\gamma = 100 \text{ g L}^{-1}$) u omjeru volumena 1:1 ($V = 700 \mu\text{L}$). Dobivena otopina intenzivno je izmiješana tijekom 20-ak sekundi (mikser EV-100, Tehnica, Železniki, Slovenija) i ostavljena minimalno 20 minuta pri sobnoj temperaturi da se proteini istalože. Centrifugiranjem (10000 g, 5 min, 4°C; Harrier 18/10 Sanyo, Watford, Velika Britanija) izdvojeni su istaloženi proteini, a dobiveni supernatant profiltriran je pomoću šprice na koje je, kao nastavak, dodan najlonski filter s porama veličine 0,20 μm (Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustava (poglavlje 3.3.6.7.4.).

3.3.6.7.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (Shimadzu, Kyoto, Japan) korišten je za određivanje koncentracije ugljikohidrata (glukoze, ksiloze, arabinoze), mliječne, octene, levulinske i mravlje kiseline u uzorcima. Za analizu priređenih uzoraka korištena je niže opisana kromatografska metoda. Kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina fosforne kiseline. Injektirano je 20 μL uzorka u sustav. Protok mobilne faze je 0,5 mL min⁻¹, a temperatura ionsko – izmjenjivačke analitičke kolone (SupelcogelTM C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s predkolumnom (SupelcogelTM H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm) 55 °C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma (RID, eng. Refractive Indeks Detector).

Obrada rezultata dobivenih kromatografskom analizom napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10). Pripadajuće vrijednosti očitane su iz baždarnih pravaca (Tablica 7).

Tablica 7. Retencijska vremena i baždarni pravci.

spoj	t_R^* (min)	jednadžba baždarnog pravca	$R^2(-)$
celobioza	11,885±0,035	$A = 221943 \cdot \gamma_{\text{celobioza}} + 838,98$	0,9999
glukoza	14,045±0,040	$A = 226208,50 \gamma_{\text{glukoza}} - 1433,13$	1,0000
ksiloza	14,834±0,037	$A = 223510 \gamma_{\text{ksiloza}} + 1070,5$	1,0000
arabinoza	16,061±0,034	$A = 225152 \gamma_{\text{arabinoza}} + 562,39$	0,9999
mliječna kiselina	18,520±0,028	$A = 119006 \gamma_{\text{mliječna kiselina}} + 1369,5$	0,9999
mravlja kiselina	18,520± 0,018	$A = 82201 \gamma_{\text{mravlja kiselina}} - 125,4$	0,9983
octena kiselina	19,825±0,026	$A = 112445 \cdot \gamma_{\text{octena kiselina}} + 1276,1$	0,9989
levulinska kiselina	21,388±0,051	$A = 207915 \gamma_{\text{levulinska kiselina}} + 3222,5$	0,9998
etanol	25,406±0,014	$A = 819297 \varphi_{\text{etanol}} - 1766,9$	0,9992

* t_R izraženo kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; A, površina

3.4. IZRAČUNAVANJE POKAZATELJA USPJEŠNOSTI RASTA I PROIZVODNJE MLIJEČNE KISELINE

3.4.1. Prinos biomase (Y_X)

$$Y_X = X - X_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [3-4]$$

X_0 - početna koncentracija biomase [g L^{-1}]

X - konačna koncentracija biomase [g L^{-1}]

3.4.2. Prinos produkta (Y_P)

$$Y_P = P - P_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [3-5]$$

P_0 - početna koncentracija produkta [g L^{-1}]

P - konačna koncentracija produkta [g L^{-1}]

3.4.3. Koeficijent pretvorbe supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$)

$$Y_{X/S} = \frac{(X-X_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{Y_X}{\Delta S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [3-6]$$

S_0, X_0 - početne koncentracije supstrata, odnosno biomase [g L^{-1}],
 S, X - konačne koncentracije supstrata, odnosno biomase [g L^{-1}],
(Marić i Šantek, 2009).

3.4.4. Koeficijent pretvorbe supstrata u produkt ($Y_{P/S}$)

$$Y_{P/S} = \frac{(P-P_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Y_P}{\Delta S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [3-7]$$

S_0, P_0 - početna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g L^{-1}],
 S, P - konačna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g L^{-1}],
(Marić i Šantek, 2009).

3.4.5. Koeficijent nastajanja produkta po biomasu ($Y_{P/X}$)

$$Y_{P/X} = \frac{(P-P_0)}{(X_0-X)} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{Y_P}{Y_X} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [3-8]$$

X_0, P_0 - početna koncentracija biomase, odnosno produkta [g L^{-1}],
 X, P - konačna koncentracija biomase, odnosno produkta [g L^{-1}],
(Marić i Šantek, 2009).

3.4.6. Brzina potrošnje supstrata (r_s)

$$\text{Ln}(S) = r_s \cdot t + b \quad [3-9]$$

3.4.7. Brzina nastajanja produkta (r_p)

$$\text{Ln}(P) = r_p \cdot t + b \quad [3-10]$$

3.4.8. Maksimalna specifična brzina rasta biomase (μ_m)

$$\text{Ln}(X) = \mu_m \cdot t + b \quad [3-11]$$

3.4.9. Produktivnost (Pr)

$$Pr = \frac{Y_X \text{ ili } Y_P}{t_U} \quad [\text{kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}] \quad [3-12]$$

Y_X - prinos biomase [g L^{-1}]

Y_P - prinos produkta [g L^{-1}]

t_U - ukupno vrijeme bioprocesa [h]

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je radu provedena alkalna predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru za predobradu lignoceluloznih sirovina s 2 %-tnom natrijevom lužinom. Procesi su provedeni pri temperaturama od 120°C, 160°C, 180°C i 210°C uz vrijeme zadržavanja od 20 minuta. Nakon predobrade čvrsta faza, koja se uglavnom sastoji od celuloze korištena je za optimiranje postupka hidrolize celulolitičkim enzimima. Tijekom postupka optimiranja enzimske hidrolize istražen je utjecaj pH vrijednosti na postotak razgradnje predobrađene pšenične slame, utjecaj različitih koncentracija supstrata, omjera mase dodanih celulaza i β -glukozidaze i supstrata (E/S omjer). Temperatura pri kojoj se provodila hidroliza čvrste faze iznosila je 40°C, što odgovara temperaturi uzgoja BMK.

Za proizvodnju mliječne kiseline na hidrolizatu predobrađene pšenične slame celulazama i β -glukozidazom kao radni mikroorganizam korištena je BMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T. Provedena je i simultana hidroliza čvrste faze dobivene nakon predobrade pšenične slame s celulazama i β -glukozidazom i fermentacija s *L. amylovorus* DSM 20351^T (SHF, eng. Simultaneous Hydrolysis and Fermentation). Fermentacije su provedene u Erlenmeyer tikvicama pri 40°C, brzini okretaja miješala od 150 okretaja u minuti i bez regulacije pH vrijednosti podloge.

Rezultati provedenih istraživanja podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

- a) Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru za predobradu lignoceluloznih sirovina (poglavljje 4.1.);
- b) Optimiranje enzimske hidrolize predobrađene pšenične slame (poglavljje 4.2.);
- c) Uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnja mliječne kiseline na enzimskim hidrolizatima predobrađene pšenične slame u Erlenmeyer tikvicama (poglavljje 4.3.);
- d) Simultana hidroliza predobrađene pšenične slame celulazama i fermentacija s BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T u Erlenmeyer tikvicama (poglavljje 4.4.).

4.1. PREDOBRAĐA PŠENIČNE SLAME U VISOKOTLAČNOM REAKTORU ZA PREDOBRAĐU LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Alkalna predobrađiva usitnjene pšenične slame provedena je u rasponu vremena zadržavanja od 1 do 20 minuta pri konstantnom tlaku pare od 20 bara i temperaturi od 210 °C uz dodatak 2%-tne natrijeve lužine (poglavljje 4.1.1.). Nakon toga provedeni su procesi alkalne predobrađive pri nižim temperaturama od 120, 160 i 180°C tijekom 20 minuta (poglavljje 4.1.2.).

Analiza sastava ugljikohidratnih polimera pšenične slame provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize te je prema dobivenim rezultatima sadržavala: 48,39 % glukana, 25,18 % ksilana i 4,3 % arabinana (Tablica 4, poglavljje 3.3.1.). Dobiveni udjeli ovih ugljikohidratnih polimera malo su viši od vrijednosti dostupnih u literaturi u kojoj se udio glukana u suhoj tvari nalazi u rasponu od 33,7 do 40,0 %, ksilana i arabinana, izraženog kao hemiceluloza od 21 do 26 %. Udjel ukupnog lignina iznosi 15,91% (Tablica 4, poglavljje 3.3.1.) te je u skladu sa podacima u radu autora Khan i Mubeen, (Khan i Mubeen, 2012; Boe i sur., 2007). Mogući razlozi odstupanja sastava analizirane slame od podataka dostupnih u literaturi su sorta korištene slame u ovom radu, klimatski pojasa u kojem je slama uzgojena, ali i korištene analitičke metode.

4.1.1. Alkalna predobrađiva pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri 210°C i različitim vremenima zadržavanja

U ovom poglavljju prikazani su rezultati dobiveni nakon alkalne predobrađive s 2% NaOH pri 210°C, tlaku pare od 20 bara i vremenima zadržavanja od 1, 10 i 20 minuta (Tablica 5, poglavljje 3.3.2.). Nakon provedene predobrađive, dobivene su dvije faze, tekuća i čvrsta faza (predobrađena pšenična slama) koje su zasebno analizirane metodama opisanim u poglavljju 3.3.6. U tekućoj fazi određena je koncentracija arabinoze, ksiloze i glukoze. Osim koncentracija ugljikohidrata određena je i koncentracija octene kiseline i nusproizvoda (npr. levulinska kiselina, mravlja kiselina i furani (furfural i HMF)). Dobiveni rezultati analize tekuće faze prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Sastavi tekućih faza dobivenih nakon predobrade pšenične slame (PS) u visokotlačnom reaktoru pri 210°C i različitim vremenima zadržavanja.

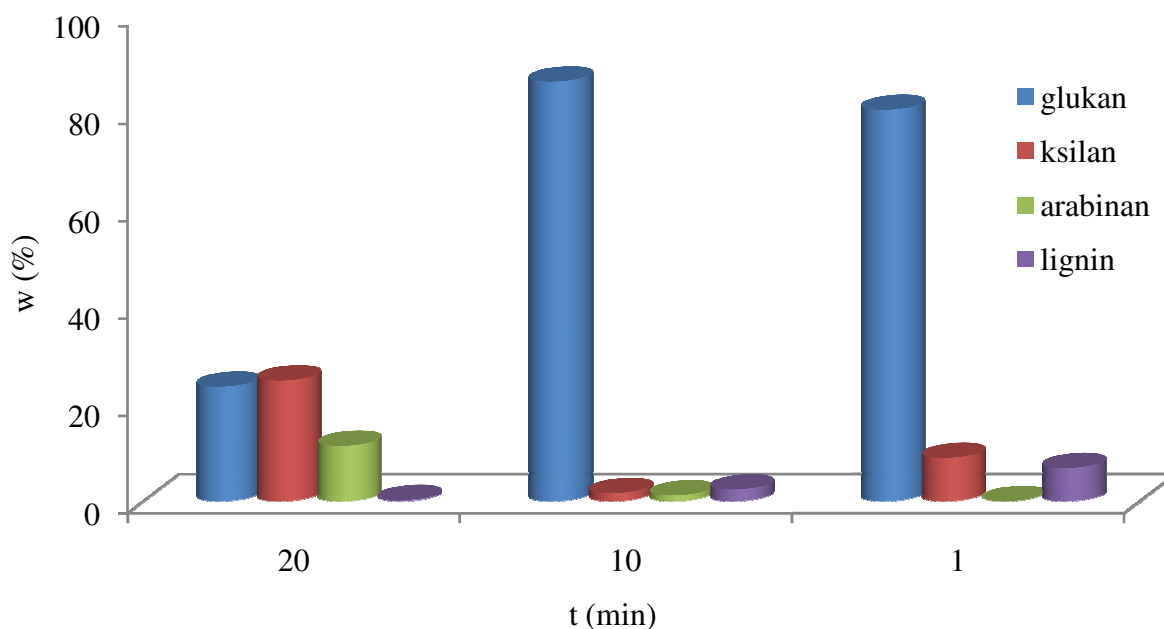
Oznaka	χ_{glukoza} (g L ⁻¹)	χ_{ksiloza} (g L ⁻¹)	$\chi_{\text{arabinoza}}$ (g L ⁻¹)	χ_{HAc} (g L ⁻¹)	χ_{formijat} (g L ⁻¹)	$\chi_{\text{levulinska kis.}}$ (g L ⁻¹)	χ_{furani} (mg L ⁻¹)	w_{LTK} (%)
PS/210 °C/ 2 % NaOH/1 min	4,81	1,58	0,23	0,08	0,75	0,00	391,09	0,86
PS/210 °C/ 2 % NaOH /10 min	6,64	0,58	0,08	0,20	0,48	0,00	368,99	0,86
PS/210 °C/ 2 % NaOH /20 min	2,10	2,13	0,87	0,04	2,59	0,00	404,25	1,04

Najveća koncentracija glukoze u tekućoj fazi određena je pri temperaturi od 210°C (20 bar) i vremenu zadržavanja od 10 minuta, dok je najveća koncentracija ksiloze i arabinoze u tekućoj fazi određena pri temperaturi od 210°C (20 bar) i vremenu zadržavanja od 20 minuta.

Koncentracija mravlje kiseline kretala se u rasponu od 0,75 g L⁻¹ do 2,59 g L⁻¹, a koncentracija furana u rasponu od 368,99 mg L⁻¹ do 404,25 mg L⁻¹. Navedene maksimalne vrijednosti su određene nakon alkalne predobrade u visokotlačnom reaktoru pri temperaturi od 210°C i vremenu zadržavanja od 20 minuta. Levulinska kiselina nije detektirana u tekućoj fazi dobivenoj alkalnom predobradom pri temperaturi od 210°C (20 bar) i vremenima zadržavanja od 1 do 20 minuta. Ovaj podatak je u skladu s podacima iz literature jer levulinska kiselina nastaje tijekom kiselinskih postupaka predobrade lignoceluloznih sirovina (Jiang i sur., 2016; Jonsson i sur., 2013).

U čvrstoj fazi (predobrađena pšenična slama) nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize određeni su udjeli ugljikohidrata (HPLC metoda, poglavlje 3.3.6.7.4.), lignina netopivog (poglavlje 3.3.6.3.) i topivog u kiselini (poglavlje 3.3.6.2.) te nusprodukata (HPLC metoda, poglavlje 3.3.6.7.4.). Prikaz udjela glavnih komponenata predobrađene pšenične slame prikazan je na Slici 9. Udio glukana u predobrađenoj pšeničnoj slami kretao se u rasponu od 23,5 % do 86,14 %, a udio ksilana i arabinana u rasponu od 1,64 % do 24,76 %, odnosno 0,00 % do 11,35 %. Najveći udio glukana u predobrađenoj pšeničnoj slami određen je pri 210°C i vremenu zadržavanja od 10 minuta. Udio lignina netopivog u kiselini u predobrađenoj pšeničnoj slami bio je u rasponu od 0,24 % (PS/210°C/2% NaOH/20 minuta) do 6,29 %

(PS/210°C/2% NaOH/1 minuta), tj. tijekom navedenih procesa uklonjeno je od 55,75 % (PS/210°C/2% NaOH/20 minuta) do 97,05 % lignina (PS/210°C/2% NaOH/1 minuta). Iako je pri uvjetima alkalne predobrade od 210°C tijekom 20 minuta postignuto gotovo potpuno uklanjanje lignina iz pšenične slame, gubitak suhe tvari u odnosu na masu pšenične slame dodanu u visokotlačni reaktor iznosi čak 92,86 %. Slično tome gubitak suhe tvari pri uvjetima alkalne predobrade od 210°C tijekom 10 minuta i dalje iznosi oko 93 %, dok je pri uvjetima alkalne predobrade od 210°C tijekom 1 minute smanjen gubitak suhe tvari i iznosi 80,31 %, ali je u ovom postupku uklonjeno oko 55,75 % lignina (Tablica 8.). Na temelju navedenih rezultata, provedene su predobrade pšenične slame pri nižim temperaturama (poglavlje 4.1.2.)



Slika 9. Maseni udjeli pojedinih komponenata čvrste faze dobiveni nakon predobrade slame u visokotlačnom reaktoru pri 210°C i različitim vremenima zadržavanja.

4.1.2. Alkalna predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama i vremenu zadržavanja od 20 minuta

U ovom poglavlju prikazani su rezultati alkalne predobrade pšenične slame provedene pri temperaturama od 120°C (1 bar), 160°C (5 bar) i 180°C (8,5 bar) tijekom 20 minuta uz dodatak 2 % natrijeve lužine. Dobivene faze, tekuća i čvrsta faza (predobrađena pšenična

slama) analizirane su analogno postupcima opisanim u poglavlju 4.1.1. Kako je u prethodnom poglavlju utvrđen veliki gubitak u masi predobrađene pšenične slame, dodatno je provedena dvostupanjska kiselinska hidroliza tekuće faze kako bi se utvrdilo koliki je udio topivih oligosaharida sa stupnjem polimerizacije većim od 2 prisutan u tekućoj fazi. Prema podacima dostupnim u literaturi oligosaharidi sa stupnjem polimerizacije do 6 su topivi u vodi (Zhang i Lynd, 2005).

Dobiveni rezultati analize tekuće faze prije i nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize prikazani su u Tablicama 9. i 10. Tako je koncentracija glukoze, ksiloze i arabinoze u svim ispitivanim uzorcima tekuće faze nakon dvostupanjske hidrolize značajno povećana. Koncentracija glukoze pri temperaturi predobrade od 120°C povećana je sa 1,35 g L⁻¹ na 3,45 g L⁻¹, dok je pri temperaturi predobrade od 160°C i 180°C povećana sa 0,01 g L⁻¹ na 4,79 g L⁻¹, odnosno 2,74 g L⁻¹. Koncentracija arabinoze u uzorcima dobivenim pri temperaturi predobrade od 120°C nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize povećana je sa 0,70 g L⁻¹ na 1,17 g L⁻¹, dok je u uzorcima dobivenim pri temperaturi predobrade od 160°C ostala približno ista ($\approx 1,30$ g L⁻¹). U uzorcima dobivenim nakon predobrade pri 180°C koncentracija arabinoze povećana je sa 1,15 g L⁻¹ na 1,89 g L⁻¹. Koncentracija ksiloze je nakon predobrade pri sve tri temperature bila u rasponu od 0,46 g L⁻¹ do 0,64 g L⁻¹, a nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize ovih uzoraka koncentracija ksiloze bila je u rasponu od 4,50 g L⁻¹ do 4,63 g L⁻¹.

Na temelju ovih podataka se može zaključiti da nakon alkalne predobrade u tekućoj fazi osim jednostavnih ugljikohidrata (glukoze, ksiloze i arabinoze) prisutni su i homo- i heteropolimeri ovih spojeva čiju koncentraciju nije moguće odrediti izravno pa je potrebno provesti hidrolizu uzoraka tekuće faze. To se dodatno može i potvrditi i sa promjenom koncentracije octene kiseline koja se povećala sa 1,98 g L⁻¹ na 2,85 g L⁻¹ (Tablica 9. i 10.) jer octena kiselina tijekom predobrade nastaje hidrolizom hemiceluloznih polimera (Jonsson i sur., 2013). Iz ovih rezultate može se zaključiti da su ksilani otporniji na alkalnu predobradu u odnosu na arabinane ($\Delta \gamma_{\text{ksiloza}} \approx 3,82 - 4,17$ g L⁻¹ > $\Delta \gamma_{\text{arabinoza}} \approx 0,00 - 0,74$ g L⁻¹).

Tablica 9. Sastav tekuće faze (prije dvostupanjske kiselinske hidrolize) dobivene nakon predobrade slame natrijevom lužinom ($w = 2 \%$) u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama i vremenu zadržavanja od 20 minuta.

T (°C)	t _z (min)	γ_{glc} (g L ⁻¹)	γ_{ksi} (g L ⁻¹)	γ_{rab} (g L ⁻¹)	γ_{LNTK} (g/L)	W _{LTK} (%)	γ_{HAc} (g L ⁻¹)	$\gamma_{mravlja\ kiselina}$ (g L ⁻¹)	$\gamma_{evulinska\ kiselina}$ (g L ⁻¹)	γ_{urani} (g L ⁻¹)
120	20	1,35	0,46	0,70	n.o.	1,50	1,37	1,57	0,06	0,16
160	20	0,01	0,68	1,34	n.o.	1,13	1,47	4,42	0,27	0,56
180	20	0,01	0,64	1,15	n.o.	1,03	1,52	5,10	0,45	0,28

n.o. nije određeno

Tablica 10. Sastav tekuće faze (nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize) dobivene nakon predobrade slame natrijevom lužinom ($w = 2 \%$) u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama i vremenu zadržavanja od 20 minuta.

T (°C)	t _z (min)	γ_{glc} (g L ⁻¹)	γ_{ksi} (g L ⁻¹)	γ_{rab} (g L ⁻¹)	γ_{LNTK} (g/L)	γ_{HAc} (g L ⁻¹)	$\gamma_{mravlja\ kiselina}$ (g L ⁻¹)	$\gamma_{evulinska\ kiselina}$ (g L ⁻¹)	γ_{urani} (g L ⁻¹)
120	20	3,45	4,63	1,17	1,20	3,35	3,38	0,00	n.o.
160	20	4,79	4,50	1,30	2,30	3,72	4,89	0,00	n.o.
180	20	2,74	4,60	1,89	2,80	3,88	7,05	0,00	n.o.

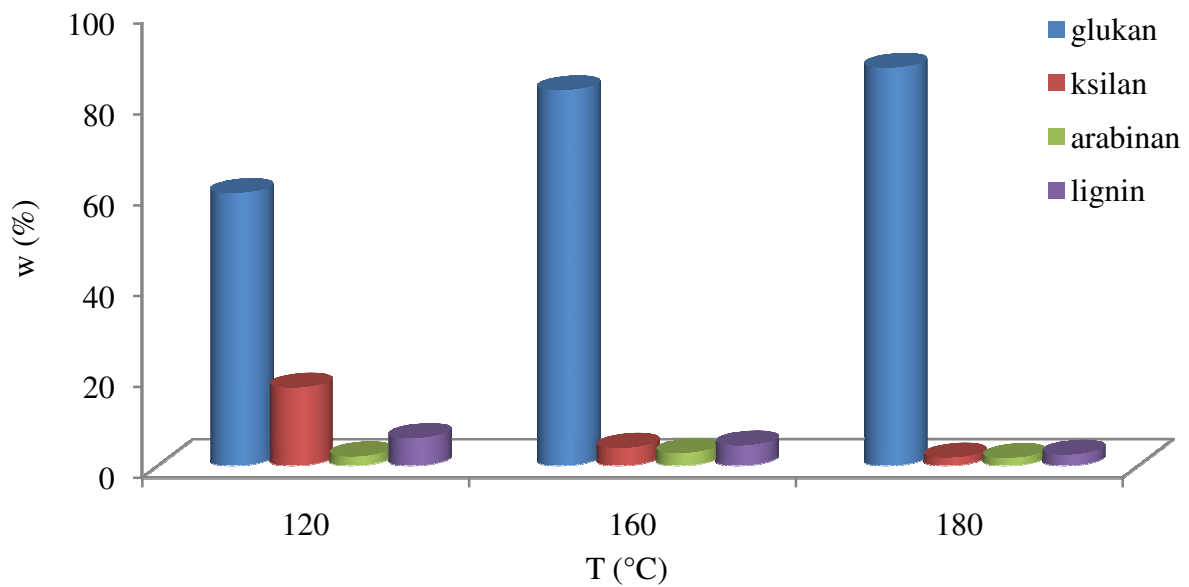
n.o. nije određeno

Rezultati i rasprava

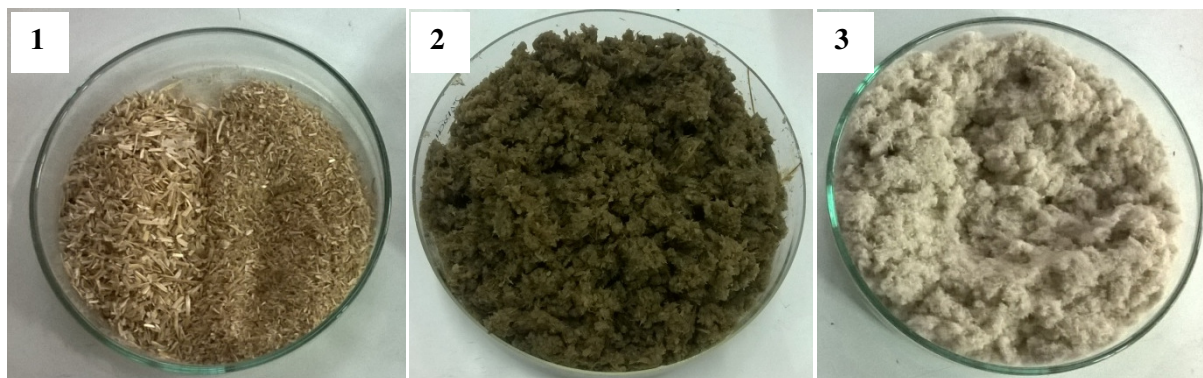
Udjeli glavnih komponenata predobrađene pšenične slame prikazani su na Slici 10. Udio glukana u predobrađenoj pšeničnoj slami pri temperaturama od 120°C do 180°C kretao se u rasponu od 60,02 % do 87,63 %, a udio ksilana i arabinana u rasponu od 1,71 % do 17,15 %, odnosno 1,71 % do 3,87 %. Najveći udio glukana u predobrađenoj pšeničnoj slami određen je pri 180°C i vremenu zadržavanja od 20 minuta ($w_{\text{glukan}} = 87,63 \%$). Udio lignina netopivog u kiselini u predobrađenoj pšeničnoj slami bio je nešto veći nego kod procesa provedenih pri 210°C i iznosio je od 2,64 % (PS/180°C/2% NaOH/20 minuta) do 6,54 % (PS/120°C/2% NaOH/1 minuta), tj. tijekom navedenih procesa uklonjeno je od 58,89 % (PS/120°C/2% NaOH/20 minuta) do 83,40 % lignina (PS/180°C/2% NaOH/20 minuta).

U ovim uvjetima nije postignuto gotovo potpuno uklanjanje lignina kao što je to slučaj kod alkalne predobrade pri 210°C tijekom 20 minuta (97,05 %). Gubitak suhe tvari u odnosu na masu pšenične slame dodanu u visokotlačni reaktor na početku procesa iznosi od 72,92 % do 83,48 % (Tablica 11.). Udio ksilana i arabinana kretao se u rasponu od 1,71 % do 17,15 % odnosno 1,63 % do 2,73 %. Najniži udjeli ksilana ($w = 1,71 \%$) i arabinana ($w = 1,63 \%$) u pšeničnoj slami određeni su nakon alkalne predobrade pri 180°C tijekom 20 minuta. Ako se dobiveni podaci za alkalnu predobradu pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri 180°C i vremenu zadržavanja od 20 minuta usporede sa sastavom filter papira ($w_{\text{glukan}} = 71,45 \%$; $w_{\text{ksilan}} = 16,55 \%$; $w_{\text{arabijan}} = 1,03 \%$, Tablica 4., poglavlje 3.3.1.) može se vidjeti da je postignut veći stupanj čistoće glukana za oko 13 %, te da je udio ksilana manji za oko 14 %.

Predobrađena pšenična slama dobivena nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru pri temperaturi od 180°C i vremenu zadržavanja od 20 minuta (Slika 11.) korištena je za provedene eksperimente enzimske hidrolize i fermentacije s BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T.



Slika 10. Maseni udjeli pojedinih komponenata čvrste faze dobivene nakon predobrade slame u visokotlačnom reaktoru pri temperaturama od 120°C do 180°C i vremenu zadržavanja od 20 minuta.



Slika 11. (1) Usitnjena pšenična slama prije alkalne predobrade sa 2 %-tnom natrijevom lužinom (PS/180°C/2% NaOH/ 20 min), (2) pšenična slama nakon alkalne predobrade sa 2 %-tnom natrijevom lužinom (PS/180°C/2% NaOH/ 20 min), (3) predobrađena pšenična slama nakon ispiranja, sušenja i mljevenja.

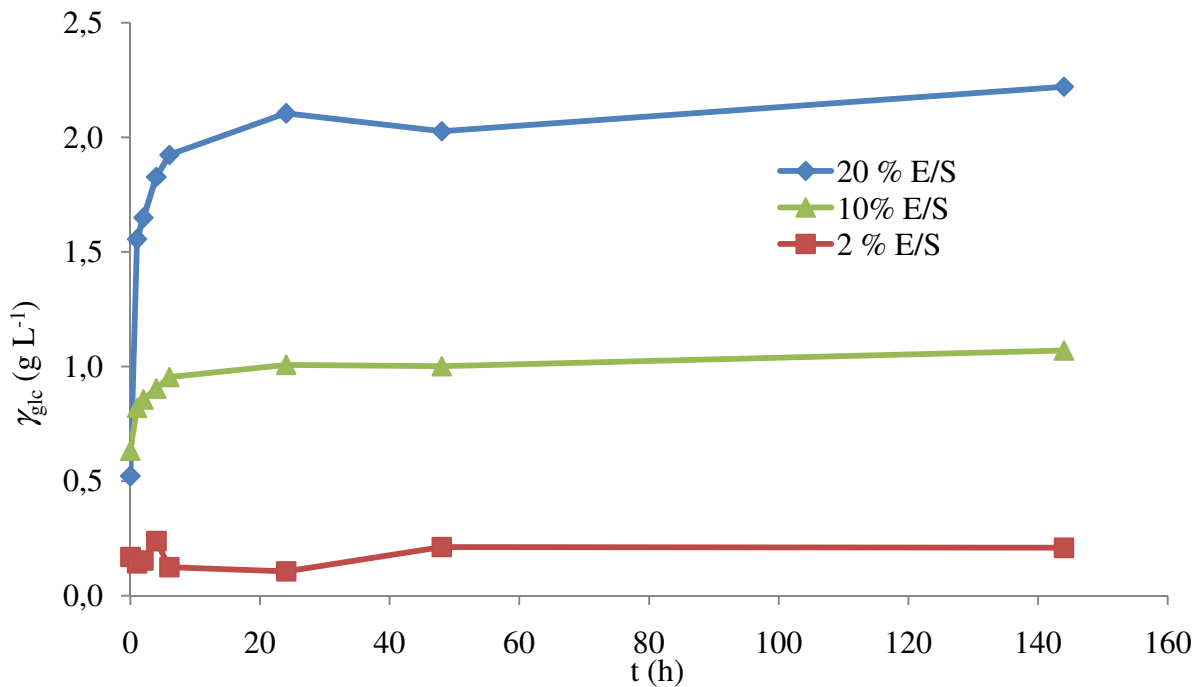
Tablica 11. Sastav glavnih komponenata pšenične slame i predobrađene pšenične slame (PPS), postotak uklanjanja lignina i gubitak suhe tvari.

	celuloza	hemiceluloza	gubitak suhe tvari	lignin	uklonjeni lignin
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
slama	48,39	29,48	0	15,91	0
PPS/210 °C/2 % NaOH/20 min	23,5	35,11	92,86	0,47	97,05
PPS/210 °C/2 % NaOH/10 min	86,14	2,80	93,04	2,44	84,66
PPS/210 °C/2 % NaOH/1 min	80,31	8,86	88,15	7,04	55,75
PPS/180°C/2 % NaOH/20 min	87,63	3,34	83,48	2,64	83,40
PPS/160 °C/2 % NaOH/20 min	82,67	6,60	76,26	4,68	70,58
PPS/120 °C/2 % NaOH/20 min	60,02	19,16	72,92	6,54	58,89

*PPS predobrađena pšenična slama

4.2. ENZIMSKA HIDROLIZA PREDOBRAĐENE PŠENIČNE SLAME

Za ispitivanje uspješnosti enzimske hidrolize odabrana je predobrađena pšenična slama dobivena nakon alkalne predobrade pšenične slame ($w_{\text{NaOH}} = 2\%$) pri 180°C (8,5 bar) uz vrijeme zadržavanja od 20 minuta (PS/180°C/2 % NaOH/ 20 min; poglavlje 3.3.3.). Kako bi se odredili optimalni uvjeti enzimske hidrolize ispitivani su: različiti omjeri enzima celulaza iz *A. niger* i supstrata (E/S omjer = 2 %, 10 % i 20 %; Slika 12.), različite pH vrijednosti (pH 4,0; 4,5; 5; 5,5 i 6,0; Slika 13.), dodatak celulaze i različitih omjera enzima β -glukozidaze i supstrata (E_{celulaza}/S omjer = 20%; E/S omjer = 2 %, 4 % i 8 %; Slika 14.-Slika 16.), maseni udjel predobrađene pšenične slame ($w = 1\%$, 2 % i 4 % suhe tvari; Tablica 12.). Enzimska hidroliza se provodila pri 40 °C i brzini okretaja miješala od 150 min⁻¹. Postupak pripreme matičnih otopina celulaza i suspenzije predobrađene pšenične slame u natrij acetatnom puferu ($c = 50$ mM) opisan je u poglavlju 3.3.3. Mljevenje supstrata smanjuje stupanj kristalčnosti lignoceluloze i na taj način povećava podložnost supstrata enzimskoj hidrolizi i poboljšava stupanj razgradnje (Han i sur., 2012). Stoga je predobrađena pšenična slama dodatno usitnjena u mlincu za kavu (poglavlje 3.2.3.).



Slika 12. Promjena koncentracije glukoze tijekom enzimske hidrolize predobrađene pšenične slame ($w = 1\%$) komercijalnim celulazama iz *A. niger* (E/S omjer 2 %, 10 % i 20 %) pri temperaturi od 40°C , broju okretaja miješala 150 min^{-1} i pH vrijednostima natrij acetatnog pufera ($c = 50\text{ mM}$) od 5,5.

Ekspirimenti kojima je utvrđen najpovoljniji omjer enzima i supstrata (predobrađene pšenične slame) prikazani su na Slici 12. E/S omjer od 2 % nije imao gotovo nikakav učinak na hidrolizu pšenične slame, dok su najviše koncentracije glukoze postignute uz E/S omjer od 20 %. Omjer celulaza i supstrata od 20 % korišten je za daljnja istraživanja enzimske hidrolize. Nadalje utvrđen je i utjecaj koncentracije supstrata (predobrađene pšenične slame, $w_{\text{PPS}} = 1\%$, 2 % i 4 %) na efikasnost hidrolize (Tablica 12.). Podaci za koncentraciju glukoze tijekom prvih 6 h hidrolize nisu analizirani (Tablica 12.) jer nije bilo moguće izuzeti uzorak zbog konzistencije priređene suspenzije. Stupanj hidrolize predobrađene pšenične slame do glukoze za tri ispitivane koncentracije supstrata iznosio je od 6,39 do 9,01 %.

Temperatura je vrlo važan faktor koji utječe na aktivnost enzima i brzinu enzimske reakcije. Optimalna temperatura za celulaze kreće se u rasponu od 45°C do 55°C , ali može i znatno varirati s obzirom na mikroorganizam producent pojedinih celulaza (Han i sur., 2012). Tijekom eksperimenata provedenih u ovom radu nije određivan utjecaj temperature na aktivnost enzima, već se hidroliza provodila pri temperaturi od 40°C . Ova temperatura je odabrana kako bi se mogla usporediti efikasnost odvojene hidrolize i fermentacije sa

Rezultati i rasprava

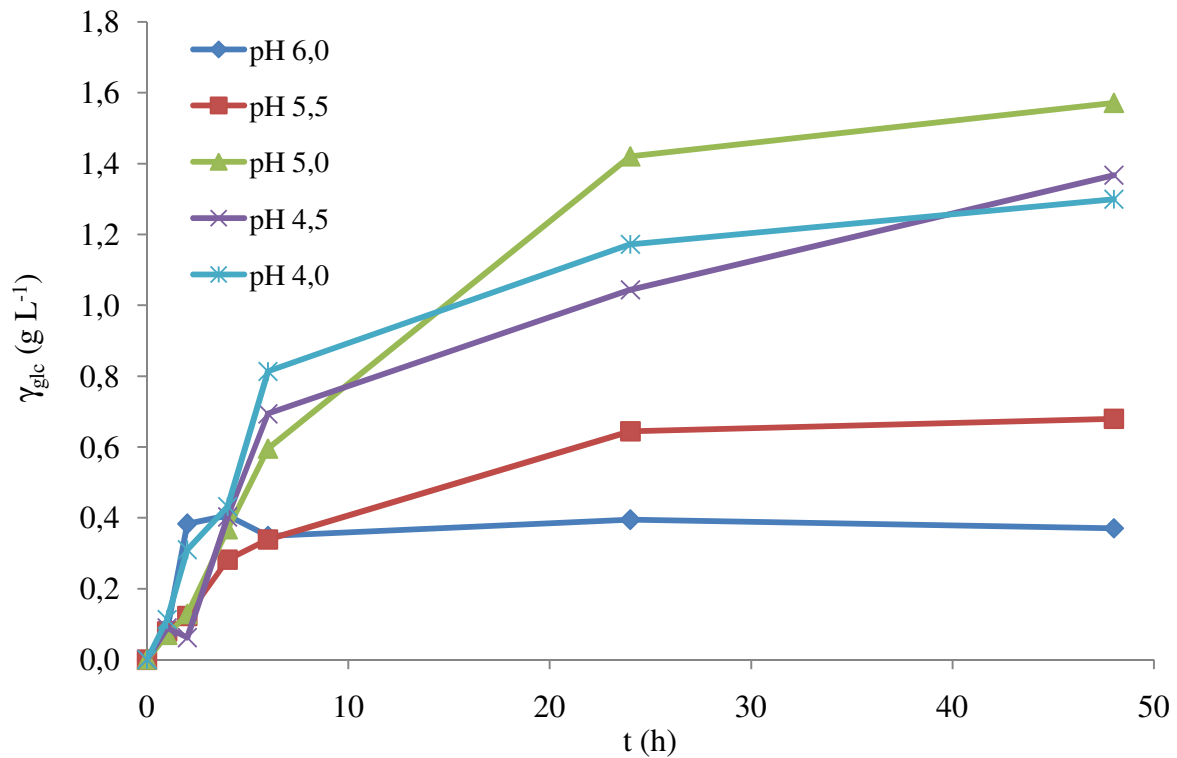
efikasnošću simultane hidrolize i fermentacije predobrađene pšenične slame do mliječne kiseline (poglavlje 4.3. i 4.4.). Ova temperatura odgovara optimalnoj temperaturi za rast bakterija mliječne kiseline. Optimalna temperatura za aktivnost celulaze iz *A. niger* kreće se u rasponu od 20 do 70°C (Anonymous 2).

Tablica 12. Promjena koncentracije glukoze tijekom hidrolize predobrađene pšenične slame (PPS) celulazama iz *A. niger* (E/S omjer 20%) i različitim početnim udjelom supstrata (w = 1, 2 i 4 %).

t(h)	w _{PPS} (%)		
	1	2	4
	%glukoza (g L ⁻¹)		
0	0,00	0,00	n.o.
1	0,08	0,77	n.o.
2	0,12	0,89	n.o.
4	0,28	1,02	n.o.
6	0,34	1,14	n.o.
24	0,64	1,25	1,15
48	0,68	1,21	4,04
144	0,87	1,42	4,04

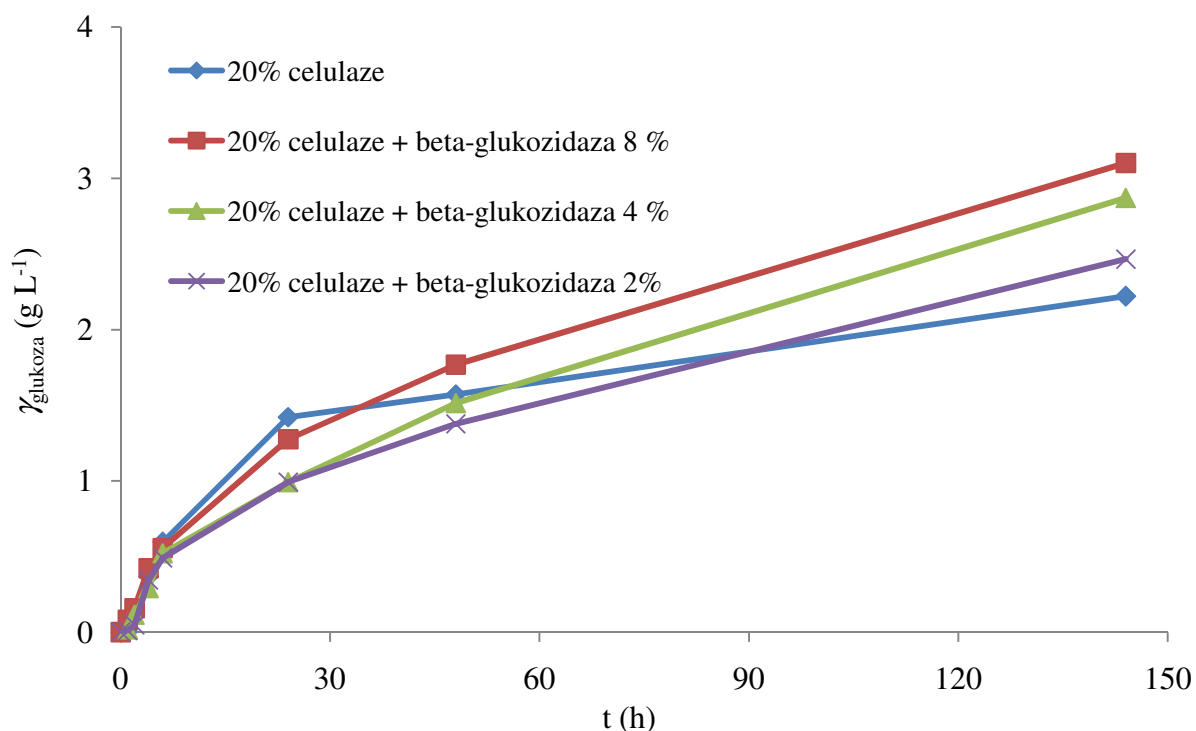
n.o. nije određeno

Utjecaj različitih pH vrijednosti (pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 i 6,0) na enzimsku hidrolizu predobrađene pšenične slame prikazan je na Slici 13. Stupanj hidrolize pšenične slame do glukoze ovisno o pH vrijednosti kretao se u rasponu od 3,33 % do 14,13 %, te je pri pH vrijednosti 5,0 postignuta najveća koncentracija glukoze u hidrolizatu koja je iznosila 1,57 g L⁻¹, odnosno stupanj hidrolize od 14,13%. Promjene u pH vrijednosti suspenzije mogu dovesti do gubitka aktivnosti ili disocijacije supstrata i katalitičke grupe u aktivnom mjestu enzima što nepovoljno utječe na brzinu enzimske reakcije (Han i sur., 2012).



Slika 13. Promjena koncentracije glukoze tijekom enzimske hidrolize predobrađene pšenične slame komercijalnim celulazama iz *A. niger* (E/S omjer 20 %) pri temperaturi od 40°C, broju okretaja miješala 150 min⁻¹ i različitim pH vrijednostima natrij acetatnog pufera (c = 50 mM) od 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 i 6,0 jedinica.

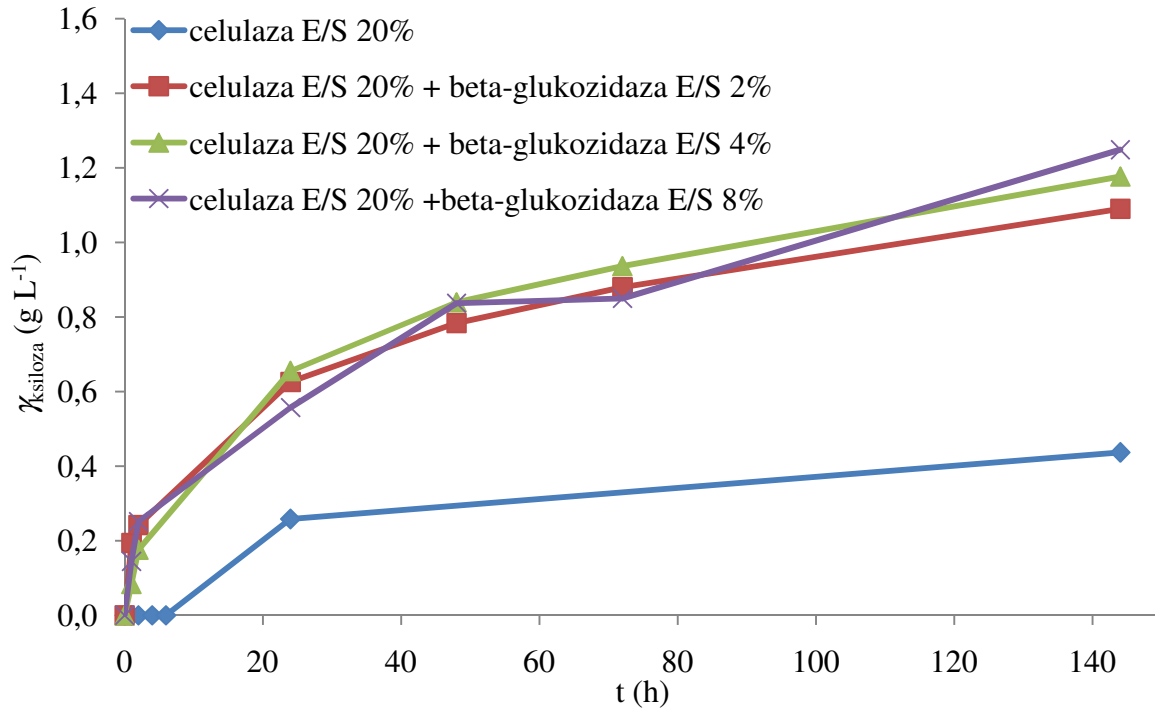
Kako je stupanj hidrolize pšenične slame do glukoze relativno nizak, ispitan je još i utjecaj dodatka različitih omjera β -glukozidaze (E/S omjer 2 %, 4 % i 8 %) iz *A. niger* na stupanj hidrolize. Tako je stupanj hidrolize uz dodatak 2 % β -glukozidaze bio veći za 2,25 % u odnosu na stupanj hidrolize samo sa celulazama. A povećanjem E/S omjera za β -glukozidazu do 8 % povećava se i stupanj hidrolize predobrađene pšenične slame do glukoze te iznosi 7,98% više nego stupanj hidrolize određen nakon eksperimenta provedenog samo sa celulazama (Slika 14.).



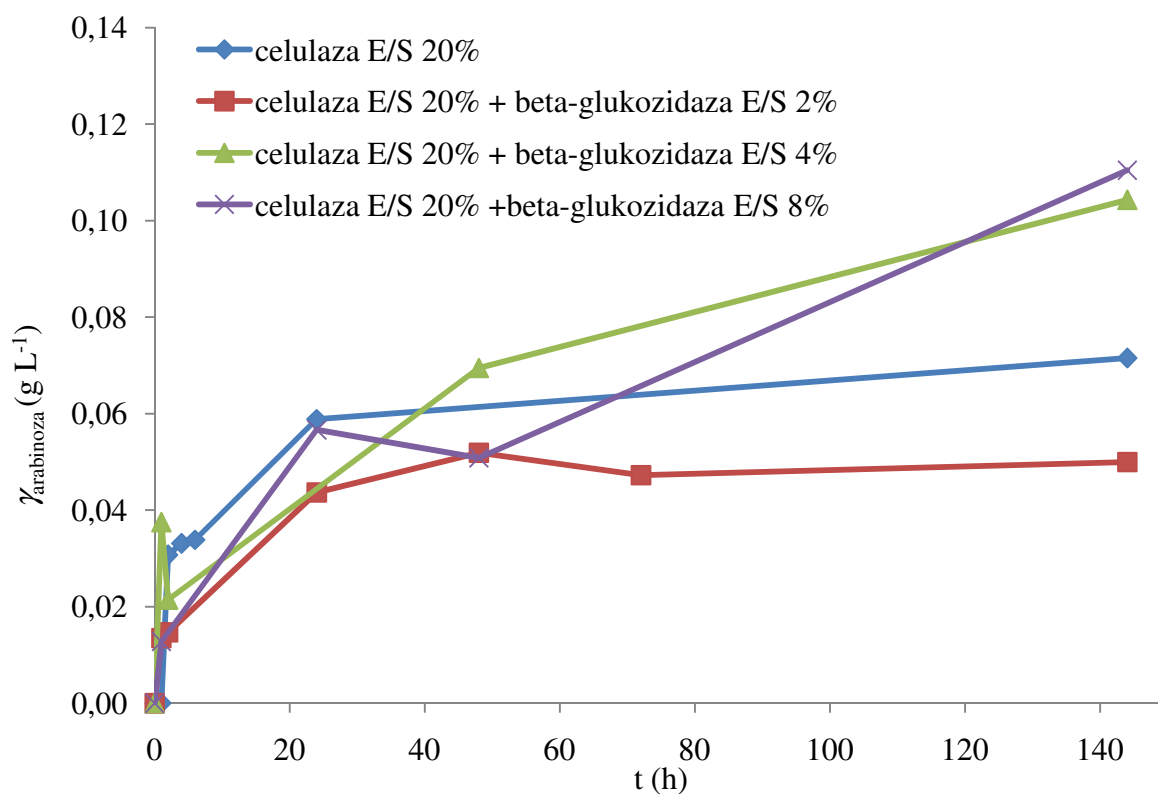
Slika 14. Promjena koncentracije glukoze tijekom enzimske hidrolize predobrađene pšenične slame komercijalnim celulozama (E/S omjer 20 %) i β -glukozidaze iz *A. niger* (E/S omjer 2 % 4 % i 8 %) pri temperaturi od 40°C, broju okretaja miješala 150 min⁻¹ i pH vrijednosti 5,0.

Osim koncentracije glukoze u enzimskim hidrolizatima predobrađene pšenične slame, HPLC metodom (poglavlje 3.3.6.7.4.) praćena je i promjena koncentracije ugljikohidrata (ksiloze i arabinoze) koji nastaju hidrolizom heteropolimera – ksilana i arabinana. Potrebno je napomenuti da korištena HPLC metoda ne može razdvojiti ksilozu, manozu i galaktozu, te da se ova tri spoja eluiraju sa kolone kao jedan pik i imaju zajedničko retencijsko vrijeme od 14,865 minuta. Udio galaktana i manana u pšeničnoj slami je vrlo mali ($w_{\text{galaktan}} = 0,75 \%$, $w_{\text{manan}} = 0,31 \%$) u odnosu na udio ksilana u pšeničnoj slami ($w_{\text{ksilan}} = 19,22 \%$, He i sur., 2016), te je kromatografski pik detektiran na retencijskom vremenu ova tri spoja identificiran kao ksiloza. Koncentracije ksiloze tijekom enzimske hidrolize celulozama i uz dodatak β -glukozidaze kreću se u rasponu od 1,09 g L⁻¹ do 1,25 g L⁻¹ nakon 144 h hidrolize (Slika 15.), a koncentracije arabinoze u rasponu od 0,04 g L⁻¹ do 0,11 g L⁻¹ nakon 144 h (Slika 16.). Navedene vrijednosti za ksilozu su od 2,5 do 2,8 puta veće nego nakon hidrolize predobrađene pšenične slame samo celulozama, a za arabinozu se ne razlikuju značajno (Slika 12.). Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da dodatak β -glukozidaze povoljno utječe

na hidrolizu heteropolimera, ksilana (manana i galaktana), a da nema značajan utjecaj na hidrolizu arabinana.



Slika 15. Promjena koncentracije ksiloze tijekom enzimske hidrolize predobrađene pšenične slame komercijalnim celulazama (E/S omjer 20 %) i β -glukozidaze iz *A. niger* (E/S omjer 2 % 4 % i 8 %) pri temperaturi od 40°C, broju okretaja miješala 150 min⁻¹ i pH vrijednosti 5,0.



Slika 16. Promjena koncentracije arabinoze tijekom enzimske hidrolize predobrađene pšenične slame komercijalnim celulazama (E/S omjer 20 %) i β -glukozidaze iz *A. niger* (E/S omjer 2 % 4 % i 8 %) pri temperaturi od 40°C, broju okretaja miješala 150 min⁻¹ i pH vrijednosti 5,0.

4.3. UZGOJ BAKTERIJE *L. amylovorus* DSM 20531^T I PROIZVODNJA MLIJEČNE KISELINE NA HIDROLIZATU PREDOBRAĐENE PŠENIČNE SLAME DOBIVENE NAKON ALKALNE PREDOBRADE

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u predobrađenoj pšeničnoj slami ($w_{PPS} = 2 \%$) koja je dobivena nakon alkalne predobrade (PS/180°C/2 % NaOH/ 20 min) pšenične slame u visokotlačnom reaktoru (poglavlje 3.3.2.). Hidroliza predobrađene pšenične slame provedena je s komercijalnim celulazama iz *A. niger* (omjer E/S 20%) i s komercijalnim celulazama (omjer E/S 20%) uz dodatak β -glukozidaze iz *A. niger* (omjer E/S 2%) pri 40°C na magnetnoj miješalici ($n = 150 \text{ min}^{-1}$, Cimarec iTM Poly15, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Hidrolize su provedene u natrij acetatnom puferu ($c = 50 \text{ mM}$) pH vrijednosti 5,0. Nakon 72 h hidrolize predobrađene pšenične slame, enzimi su inaktivirani kuhanjem tikvice s hidrolizatom tijekom 20 minuta. Nakon toga je u hidrolizat dodana sterilna otopina kvašćevog ekstrakta i peptona tako da je koncentracija ovih spojeva u podlozi iznosila 5 g L^{-1} (poglavlje 3.3.3.).

Prvo je provedena hidroliza celulazama (omjer E/S 20 %) iz *A. niger* pri 40°C i pH vrijednosti 5,0 (natrij acetatni pufer, $c = 50 \text{ mM}$) i nakon toga fermentacija s *L. amylovorus* DSM 20531^T (Poglavlje 4.3.1). Hidroliza predobrađene pšenične slame provedena je u istim uvjetima i uz dodatak celulaza (omjer E/S 20 %) i β -glukozidaze (omjer E/S 2 %) iz *A. niger* i nakon toga fermentacija s pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T (poglavlje 4.3.2.). Svi uzgoji su provedeni šaržnim postupkom pri 40°C i bez regulacije pH vrijednosti podloge na magnetnoj miješalici ($n = 150 \text{ min}^{-1}$, Cimarec iTM Poly15, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) u Erlenmeyer tikvicama. Rezultati analize izuzetih uzoraka tijekom uzgoja prikazani su Slikama 17.-24., a kinetički parametri potrošnje supstrata, rasta biomase i proizvodnje mliječne kiseline prikazani su Tablicama 13.-16.

4.3.1. Uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnja mliječne kiseline na predobrađenoj pšeničnoj slami hidroliziranoj celulazama iz *A. niger*

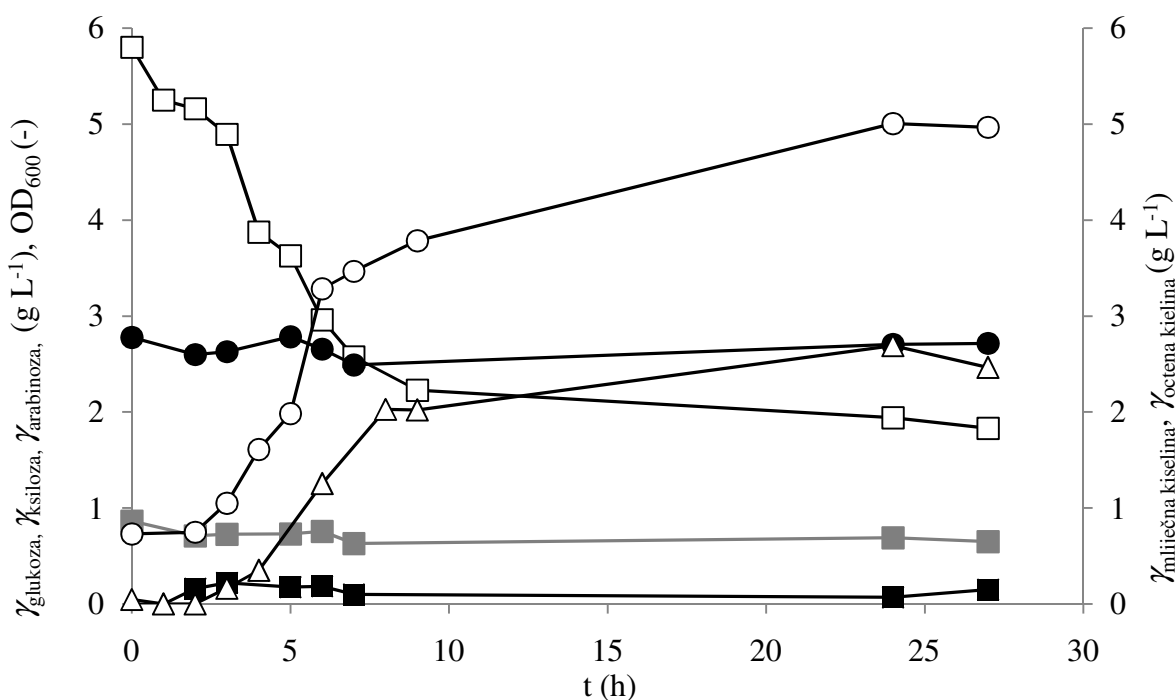
Dodatkom preko noći poraslog inokuluma (2,5 % vol/vol) započet je uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnja mliječne kiseline u podlozi koja se sastoji od hidrolizata predobrađene pšenične slame, kvašćevog ekstrakta i peptona. Kao glavni izvor ugljika korišteni su ugljikohidrati koji se nalaze u hidrolizatu pšenične slame (glukoza, ksiloza (manosa i galaktoza) i arabinoza. Navedeni ugljikohidrati su građevne jedinice polimera lignoceluloznih sirovina (Boguta i sur., 2014). Rezultati analize izuzetih uzoraka tijekom uzgoja prikazani su na Slici 17., a promjena broja živih stanica tijekom 27 h uzgoja na Slici 18. Kinetički parametri potrošnje supstrata, rasta biomase i proizvodnje mliječne kiseline prikazani su Tablicama 13. i 14.

Tijekom uzgoja provedenog u podlozi koja se sastoji od hidrolizata predobrađene pšenične slame dobivenog s pomoću celulaza lag faza je trajala 2 sata. Nakon toga je bakterija ušla u eksponencionalnu fazu rasta koja je trajala 7 sati, te na kraju u stacionarnu fazu rasta gdje nije bilo povećanja koncentracije mliječne kiseline. HPLC analizom tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T praćena je promjena koncentracije glukoze, arabinoze, ksiloze, mliječne i octene kiseline (Slika 17.). Bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T može fermentirati neke od ugljikohidrata koji nastaju hidrolizom lignoceluloze kao što su celobioza, glukoza, manosa i galaktoza, a ne može fermentirati arabinozu i ksilozu (Nakamura, 1981).

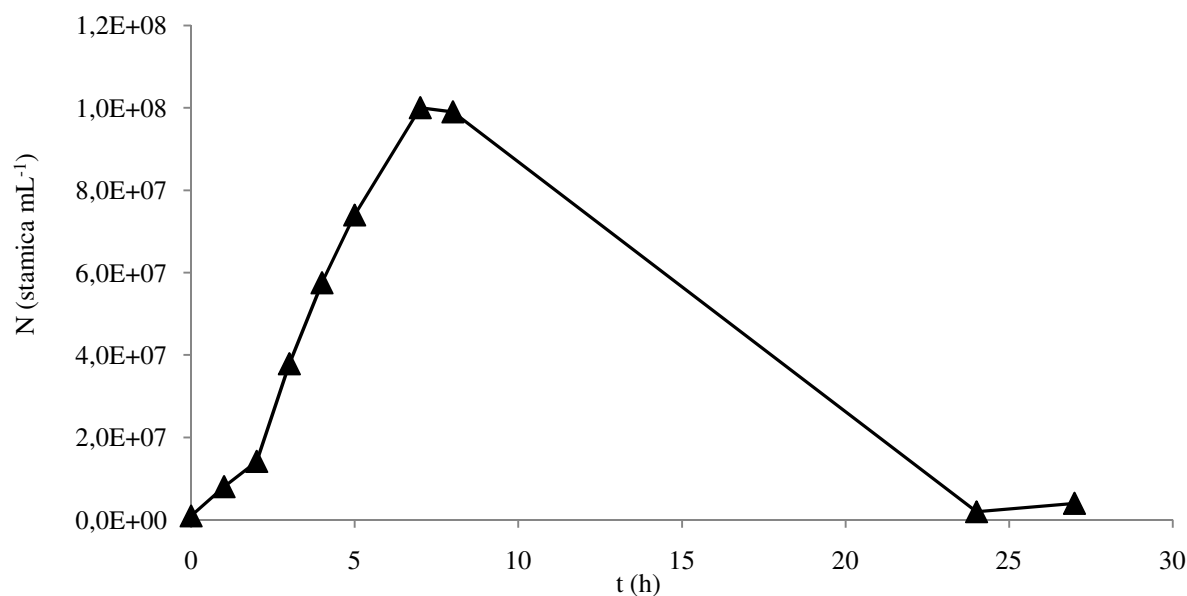
Prema podacima dobivenim HPLC analizom tijekom rasta bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T zabilježena je mala promjena u koncentraciji ksiloze ($\Delta\gamma_{ksi} = 0,21 \text{ g L}^{-1}$), a koncentracija arabinoze bila je konstantna ($\Delta\gamma_{arab} = 0,00 \text{ g L}^{-1}$; Slika 17.). Korištenom HPLC metodom određeno je da je retencijsko vrijeme ksiloze 14,848 min, galaktoze 14,925 min i manose 14,915 min. Kada se navedena tri ugljikohidrata injektiraju u sustav zajedno u otopini eluiraju se kao jedan pik i imaju jedinstveno retencijsko vrijeme od 14,865 min. Kako je već spomenuto u poglavlju 4.2. udio galaktana i manana ($w_{galaktan} = 0,75 \%$, $w_{manan} = 0,31 \%$) u pšeničnoj slami iznosi manje od 5% od udjela ksilana u pšeničnoj slami (19,22 %, He i sur., 2016), te je pik detektiran na retencijskom vremenu ova tri spoja identificiran kao ksiloza. Iz navedenog bi se smanjenje koncentraciji ksiloze ($\Delta\gamma_{ksi} = 0,21 \text{ g L}^{-1}$), tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T moglo objasniti potrošnjom drugih ugljikohidrata prisutnih u hidrolizatu pšenične slame, arabinoze i galaktoze koje ova bakterija može koristiti kao izvor ugljika, a ne kao potrošnja ksiloze.

Maksimalna specifična brzina rasta (μ_m) ove bakterije iznosila je $0,50 \text{ h}^{-1}$ uz produktivnost mliječne kiseline (Pr_{MK}) od $0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tablica 13. i Tablica 14.). Slična μ_m ($0,41 - 0,67 \text{ h}^{-1}$) i veća Pr_{MK} ($1,05 - 1,69 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) dobiveni su uzgojem bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T u MRS podlozi i modificiranim MRS podlogama sa saharozom i škrobom uz regulaciju pH vrijednosti ($5,5 \pm 0,2$) pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (Trontel i sur., 2011).

Tijekom eksponencionalne faze rasta postignut je najveći prinos mliječne kiseline, a maksimalno postignuta koncentracija mliječne kiseline iznosila je $\gamma_{MK_m} = 4,97 \text{ g L}^{-1}$. Također je praćena promjena koncentracije octene kiseline kako bi se utvrdilo provodi li ovaj soj u navedenim uvjetima homo- ili heterofermentaciju. Acetat je u podlogu dodan kao sol natrijevog acetata jer se enzimaska hidroliza provodila u natrij acetanom puferu pH vrijednosti 5,0 ($c = 50 \text{ mM}$). Tijekom fermentacije nije došlo do promjene koncentracije octene kiseline ($\Delta \gamma_{\text{octena kislina}} \approx 0,06 \text{ g L}^{-1}$) što je dokaz da bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T homofermentativnim putem fermentira ugljikohidrate do mliječne kiseline. Osim toga, HPLC analizom nisu detektirani drugi proizvodi heterofermentacije, poput etanola ili mravlje kiseline.



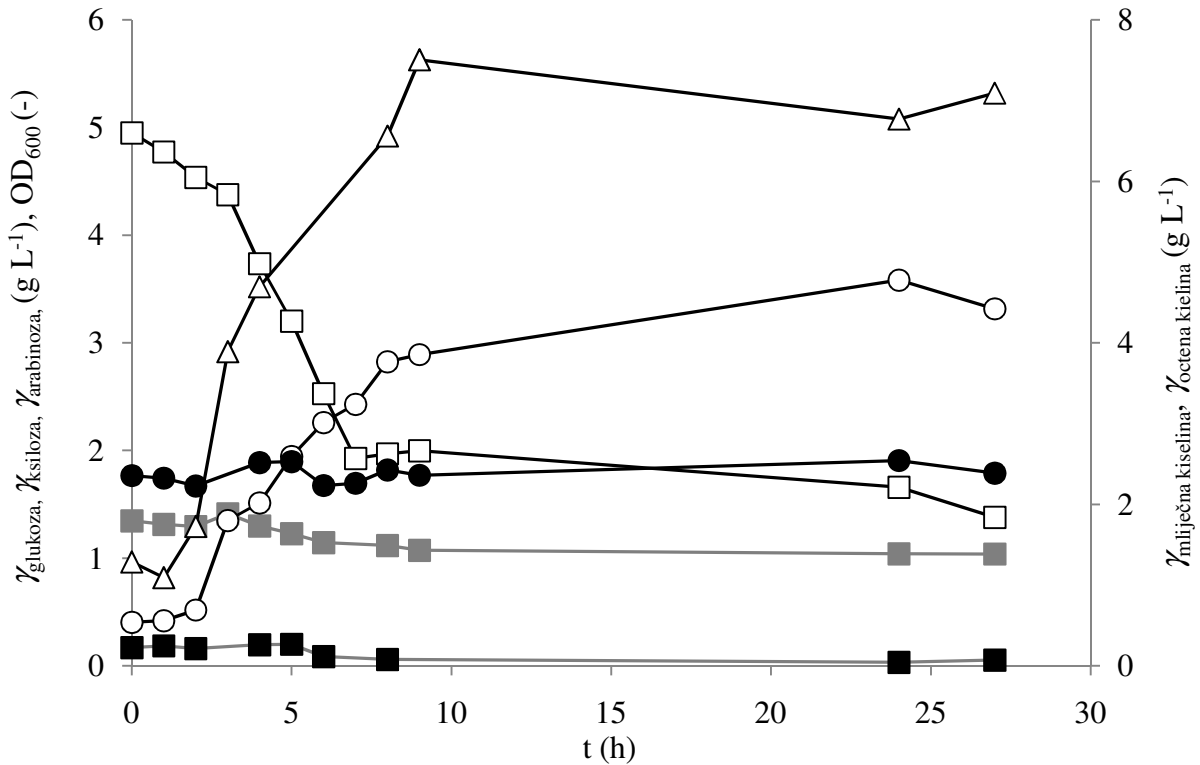
Slika 17. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare), arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare), mliječne (γ_{MK} , \circ), octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) i optičke gustoće (OD₆₀₀, \triangle) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na predobrađenoj čvrstoj fazi pšenične slame hidroliziranoj celulazama.



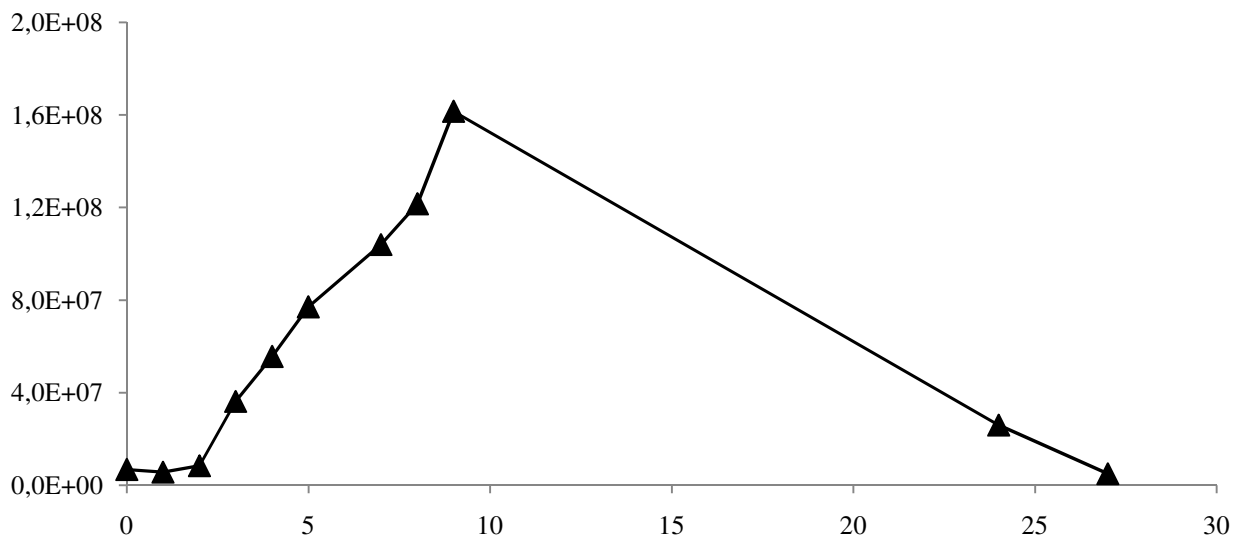
Slika 18. Promjene broja živih stanica (N, ▲) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na predobrađenoj čvrstoj fazi pšenične slame hidroliziranoj celulazama.

4.3.2. Uzgoj bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnja mliječne kiseline na predobrađenoj pšeničnoj slami hidroliziranoj celulazama i β -glukozidazom iz *A. niger*

Rezultati dobiveni tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T i proizvodnje mliječne kiseline na predobrađenoj pšeničnoj slami hidroliziranoj celulazama i β -glukozidazom iz *A. niger* su na Slici 19., a promjena broja živih stanica tijekom 27 h uzgoja na Slici 20. Kinetički parametri potrošnje supstrata, rasta biomase i proizvodnje mliječne kiseline prikazani su Tablicama 13. i 14.



Slika 19. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare), arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare), mliječne (γ_{MK} , \circ), octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) i optičke gustoće (OD₆₀₀, \triangle) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na predobrađenoj čvrstoj fazi pšenične slame hidroliziranoj celulazama i β -glukozidazom.



Slika 20. Promjene broja stanica (N, \blacktriangle) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na predobrađenoj čvrstoj fazi pšenične slame hidroliziranoj celulazama i β -glukozidazom.

Tijekom uzgoja provedenog s pomoću *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu predobrađene pšenične slame dobivenom enzimskom hidrolizom celulazama i β -glukozidazom iz *A. niger*, lag faza je trajala 2 sata, a eksponencijalna faza rasta 7 sati, te je nakon 27 h bioprocasa postignuta koncentracija mliječne kiseline od $\chi_{MK_m} = 4,42 \text{ g L}^{-1}$. Dobivene vrijednosti za koncentraciju mliječne kiseline su oko 10 % manje nego vrijednosti određenim tijekom uzgoja na predobrađenoj pšeničnoj slami hidroliziranoj samo celulazama ($\chi_{MK_m} = 4,97 \text{ g L}^{-1}$). Koncentracija octene kiseline tijekom uzgoja nije se mijenjala ($\Delta\chi_{HAc} \approx 0,03 \text{ g L}^{-1}$), te nisu nastali drugi proizvodi metabolizma (etanol ili mravlja kiselina).

Usporedbom uzgoja na hidrolizatu koji je dobiven enzimskom hidrolizom pomoću celulaza i uzgoja na hidrolizatu dobivenom enzimskom hidrolizom kombinacijom enzima celulaze i β -glukozidaze, vidljivo je da nema značajne razlike u prinosu mliječne kiseline i produktivnost procesa ($Pr_{MK} = 0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ i $Pr_{MK} = 0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). I tijekom ovog uzgoja zabilježena je mala promjena u koncentraciji ksiloze ($\Delta\chi_{ksi} = 0,30 \text{ g L}^{-1}$), iako je početna koncentracija ksiloze iznosila $1,34 \text{ g L}^{-1}$ u odnosu na uzgoj proveden na hidrolizatu predobrađene pšenične slame s celulazama ($\chi_{ksiloza \text{ početno}} = 0,86 \text{ g L}^{-1}$). Razlog tomu vjerojatno je dodatak β -glukozidaze koja prema ovim podacima (poglavlje 4.2.) pospješuje hidrolizu heterooligosaharida. I ovdje bi se kao u poglavlju 4.3.1. smanjenje koncentraciji ksiloze ($\Delta\chi_{ksi} = 0,30 \text{ g L}^{-1}$), tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T moglo objasniti potrošnjom drugih ugljikohidrata prisutnih u hidrolizatu pšenične slame, arabinoze i galaktoze koje ova bakterija može koristiti kao izvor ugljika.

Maksimalna specifična brzina rasta (μ_m) ove bakterije iznosila je $0,39 \text{ h}^{-1}$ uz produktivnost mliječne kiseline (Pr_{MK}) od $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tablica 13.).

Tablica 13. Pokazatelji uspješnosti rasta biomase dobiveni tijekom uzgoja bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu predobrađene pšenične slame pri 40 °C i bez regulacije pH vrijednosti.

tip procesa	t _{FAZE RASTA} (h)		r_{glc} (h ⁻¹)	μ_m (h ⁻¹)
	lag	eksp		
<i>f</i> (celulaze)	2	7	0,14	0,50
<i>f</i> (celulaze + β -glukozidaza)	2	7	0,20	0,39

Tablica 14. Pokazatelji uspješnosti proizvodnje mliječne kiseline dobiveni tijekom uzgoja bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T na hidrolizatu predobrađene pšenične slame pri 40 °C i bez regulacije pH vrijednosti.

tip procesa	r_{MK}	γ_{MK_m}	Y_{P/S^*}	Pr_{MK}
	(h ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g g ⁻¹)	(g L ⁻¹ h ⁻¹)
f (celulaze)	0,36	4,97	0,22	0,16
f (celulaze + β -glukozidaza)	0,36	4,42	0,20	0,15

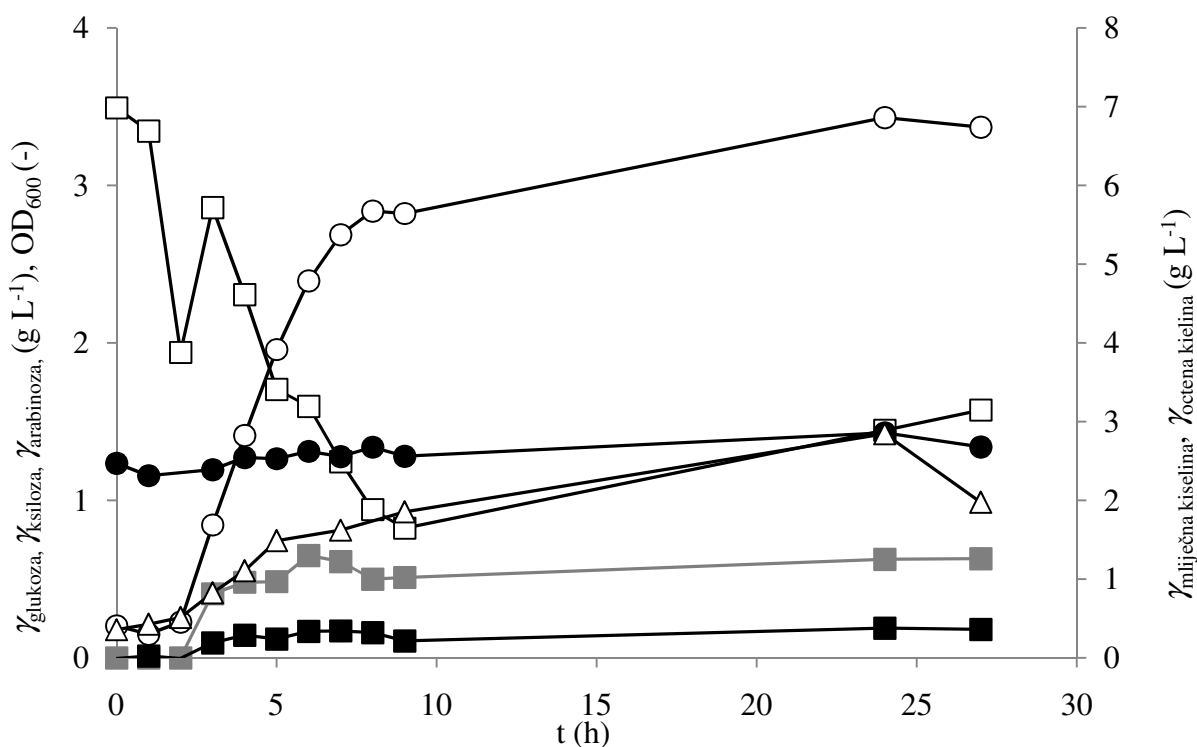
*S označava koncentraciju dodane sirovine (čvrsti dio dobiven nakon alkalne predobrade pšenične slame)

4.4. SIMULTANA HIDROLIZA PREDOBRAĐENE PŠENIČNE SLAME CELULOLITIČKIM ENZIMIMA I FERMENTACIJA S POMOĆU BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T

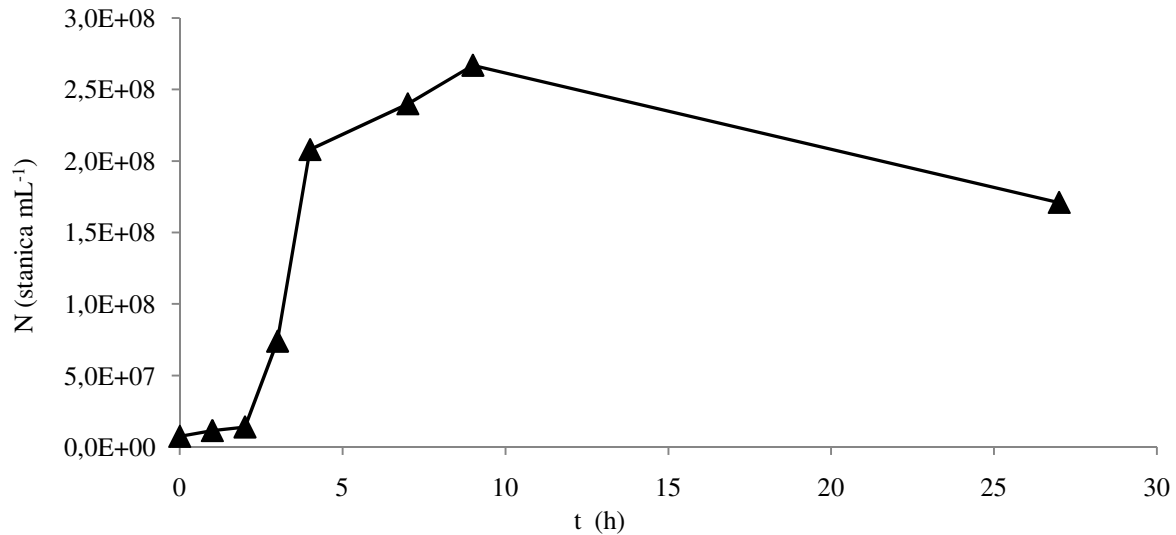
U ovom su poglavlju prikazani rezultati simultane hidrolize predobrađene pšenične slame (PS/180°C/2% NaOH/20 min) celulolitičkim enzimima (celulaze i β -glukozidaze) iz *A. niger* i fermentacije nastalih jednostavnih ugljikohidrata do mliječne kiseline s pomoću BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T (poglavljje 3.3.5.). Fermentacije su provedene pri 40°C i bez regulacije pH vrijednosti podloge na magnetnoj miješalici ($n = 150 \text{ min}^{-1}$, Cimarec iTM Poly15, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) u Erlenmeyer tikvicama. U poglavlju 4.4.1. prikazani su rezultati bioprocesa simultane hidrolize i fermentacije s pomoću BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T uz dodatak celulaza iz *A. niger*, a u poglavlju 4.4.2. prikazani su rezultati bioprocesa simultane hidrolize i fermentacije s pomoću BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T uz dodatak celulaza i β -glukozidaze iz *A. niger*. Rezultati analize izuzetih uzoraka tijekom uzgoja prikazani su na Slikama od 21. do 23., a kinetički parametri potrošnje supstrata, rasta biomase i proizvodnje mliječne kiseline prikazani su Tablicama 15. i 16.

4.4.1. Simultana hidroliza predobrađene pšenične slame s celulazama iz *A. niger* i fermentacija s pomoću BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T

Ekperimentalni podaci dobiveni tijekom bioprocasa simultane hidrolize predobrađene pšenične slame s celulazama iz *A. niger* i fermentacije nastalih jednostavnih ugljikohidrata s pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T pokazuju da ova bakterija raste i proizvodi mliječnu kiselinu (Slika 21. i Slika 22.).



Slika 21. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare), arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare), mliječne (γ_{MK} , \circ), octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) i optičke gustoće (OD_{600} , \triangle) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na predobrađenoj čvrstoj fazi pšenične slame.



Slika 22. Promjene broja stanica (N, ▲) tijekom simultane hidrolize predobrađene pšenične slame celulazama i fermentacije s pomoću bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T.

Tijekom uzgoja bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T glukoza se troši brzinom od $r_{\text{glc}} = 0,17 \text{ h}^{-1}$. Najnižu vrijednost koncentracije glukoze postiže se u 9 h uzgoja ($\gamma_{\text{glc}} = 0,80 \text{ g L}^{-1}$), te se nakon toga ona povećava do 27 h uzgoja i iznosi $\gamma_{\text{glc}} = 1,58 \text{ g L}^{-1}$. Na temelju ovih podataka može se zaključiti da je od 9 h do 27 h uzgoja brzina hidrolize predobrađene pšenične slame veća od brzine potrošnje glukoze. Ovi podaci se poklapaju i sa krajem eksponencijalne faze rasta BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T (Slika 21). Od početka uzgoja zabilježen je i rast koncentracije ksiloze ($\Delta\gamma_{\text{ksi}} = 0,63 \text{ g L}^{-1}$) i arabinoze ($\Delta\gamma_{\text{rab}} = 0,18 \text{ g L}^{-1}$). Specifična brzina rasta tijekom ovog bioprocasa iznosila je $0,30 \text{ h}^{-1}$ i bila je manja nego kod bioprocasa odvojene hidrolize i fermentacije ($\mu_{\text{m}} = 0,50 \text{ h}^{-1}$).

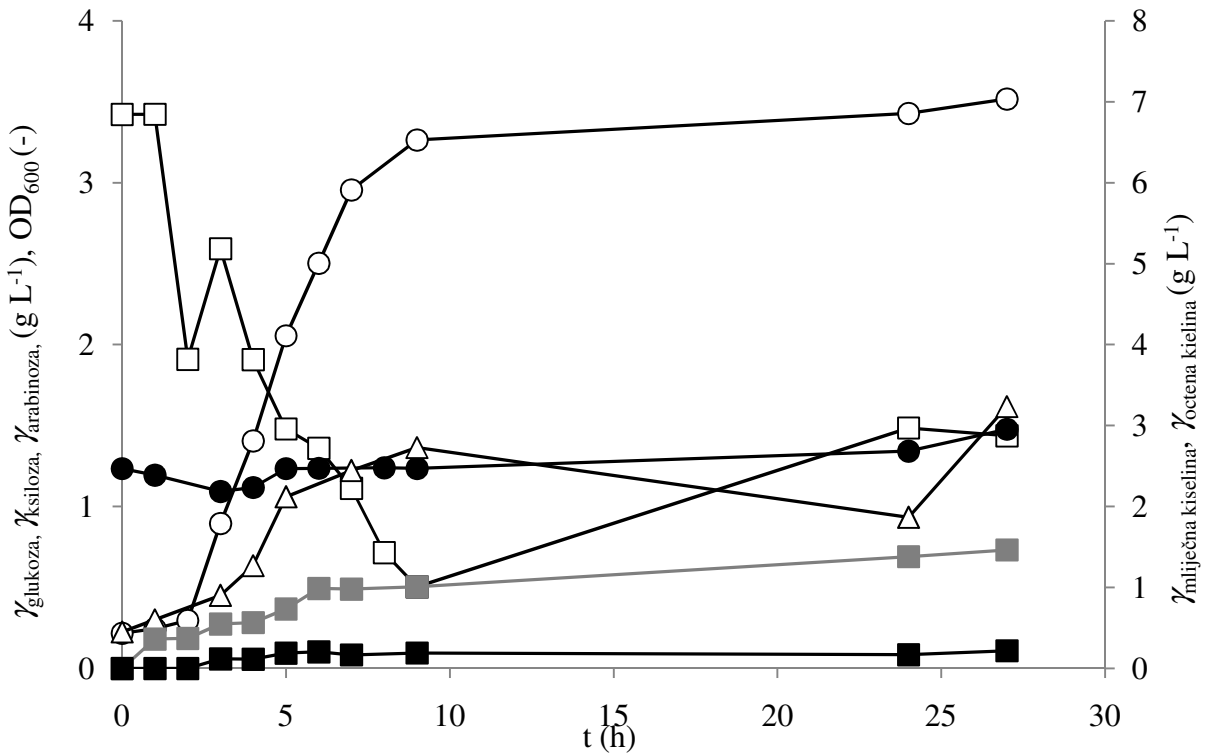
Prinos mliječne kiseline je za 36 % veći kod simultane hidrolize predobrađene pšenične slame s celulazama i fermentacije nego kod odvojenog procesa odvojene hidrolize s celulazama [$\gamma_{\text{MK}_m} = 4,97 \text{ g L}^{-1}$ (odvojeno) i $\gamma_{\text{MK}_m} = 6,74 \text{ g L}^{-1}$ (simultano)]. Slično tome i produktivnost mliječne kiseline je za 44 % veća kod simultane hidrolize i fermentacije u odnosu na odvojene procese hidrolize i fermentacije [$Pr_{\text{MK}} = 0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (odvojeno) i $Pr_{\text{MK}} = 0,23 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (simultano)].

4.4.2. Simultana hidroliza predobrađene pšenične slame s celulazama i β -glukozidazom iz *A. niger* i fermentacija s pomoću BMK *L. amylovorus* DSM 20531^T

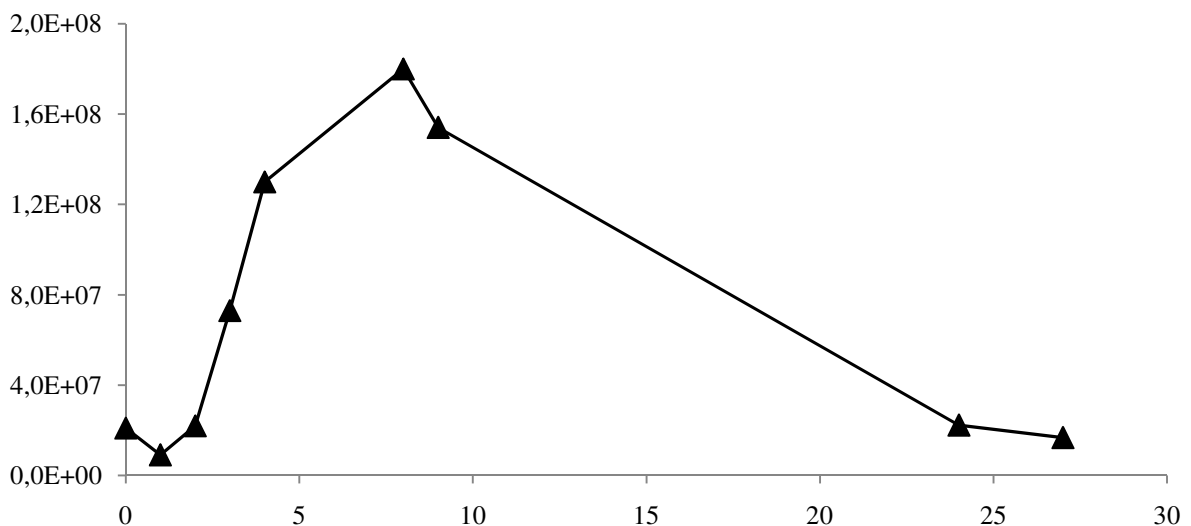
Simultana hidroliza predobrađene pšenične slame celulazama i β -glukozidazom iz *A. niger* i fermentacija s pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T trajala je 27 sata. Nakon lag faze koja je trajala oko 2 sata bakterija je ušla u eksponencijalnu fazu rasta ($t_{exp} = 7$ h) na kraju koje je postignuta koncentracija mliječne kiseline ($\gamma_{MK} = 6,82$ g L⁻¹) uz brzinu proizvodnje mliječne kiseline od 0,57 h⁻¹ (Tablica 16.). Tijekom procesa zabilježena je brzina potrošnje glukoze (r_{glc}) od 0,17 h⁻¹. Tijekom bioprocesa nije utrošena sva glukoza iz podloge te je njezina koncentracija bila najniža nakon 9 h uzgoja i ona iznosi $\gamma_{glukoza} = 0,50$ g L⁻¹ nakon čega se ova vrijednost povećavala i u 27 h uzgoja dostigla vrijednost od $\gamma_{glc} = 1,46$ g L⁻¹. Nakon 9 h uzgoja bakterija ulazi u stacionarnu fazu rasta (Slika 23. i 24.) i smanjuje se brzina potrošnje glukoze, te se može zaključiti da je u vremenu od 9 h do 27 h brzina hidrolize veća od brzine potrošnje glukoze. Tijekom cijelog bioprocesa povećava se i koncentracija ksiloze ($\Delta\gamma_{ksiloza, 27h} = 1,47$ g L⁻¹) i arabinoze ($\Delta\gamma_{arabinoza, 27h} = 0,22$ g L⁻¹) (Slika 23.).

Najveći prinos i produktivnost mliječne kiseline dobivena je u bioprocesu simultane hidrolize s celulazama i β -glukozidazom i fermentacije nastalih ugljikohidrata do mliječne kiseline ($\gamma_{MK_m} = 7,03$ g L⁻¹ i $Pr_{MK} = 0,24$ g L⁻¹ h⁻¹) u odnosu na ostale provedene bioprocese (Tablica 13.-16.). Tijekom fermentacije nije došlo do proizvodnje octene kiseline ni drugih proizvoda fermentacije (mravlja kiselina i etanol). Maksimalna specifična brzina rasta (μ_m) ove bakterije iznosila je 0,30 h⁻¹ i manja je za 23 - 40 % u odnosu na bioprocese odvojene hidrolize i fermentacije (Tablica 15.).

Prinos mliječne kiseline je za 58 % veći kod simultane hidrolize čvrste faze s celulazama i β -glukozidazom i fermentacije nego kod odvojenog procesa hidrolize, nakon kojeg je slijedio uzgoj i proizvodnja mliječne kiseline [$\gamma_{MK_m} = 4,42$ g L⁻¹ (odvojeno) i $\gamma_{MK_m} = 7,03$ g L⁻¹ (simultano)]. Slično tome i produktivnost mliječne kiseline je za 60 % veća kod simultane hidrolize s celulazama u odnosu na odvojene procese hidrolize s celulazama i fermentacije, nakon kojeg je slijedio uzgoj i proizvodnja mliječne kiseline [$Pr_{MK} = 0,15$ g L⁻¹ h⁻¹ (odvojeno) i $Pr_{MK} = 0,24$ g L⁻¹ h⁻¹ (simultano)].



Slika 23. Promjene koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare), araboze (γ_{arab} , \blacksquare), mliječne (γ_{MK} , \circ), octene kiseline (γ_{OK} , \bullet) i optičke gustoće (OD_{600} , \triangle) tijekom uzgoja bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T na predobrađenoj čvrstoj fazi pšenične slame.



Slika 24. Promjene broja stanica (N, \blacktriangle) tijekom simultane hidrolize predobrađene pšenične slame celulazama i β -glukozidazom i fermentacije s pomoću bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T.

Tablica 15. Pokazatelji uspješnosti rasta biomase dobiveni tijekom simultane hidrolize predobrađene pšenične slame i fermentacije s pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T pri 40 °C i bez regulacije pH vrijednosti.

Tip procesa	t _{FAZERASTA} (h)		r _{glc}	μ _m
	lag	eksp	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)
SHF (celulaze)	2	6	0,17	0,30
SHF (celulaze +β-glukozidaza)	2	6	0,17	0,31

Tablica 16. Pokazatelji uspješnosti proizvodnje mliječne kiseline dobiveni tijekom simultane hidrolize predobrađene pšenične slame i fermentacije s pomoću bakterije *L. amylovorus* DSM 20531^T pri 40 °C i bez regulacije pH vrijednosti.

Tip procesa	r _{MK}	γ _{MK_m}	Y _{P/S}	Pr _{MK}
	(h ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g g ⁻¹)	(g L ⁻¹ h ⁻¹)
SHF (celulaze)	0,68	6,74	0,30	0,23
SHF (celulaze +β-glukozidaza)	0,57	7,03	0,33	0,24

S označava koncentraciju dodane sirovine (čvrsti dio dobiven nakon alkalne predobrade pšenične slame)

5. ZAKLJUČCI

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

1. Nakon alkalne predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru, pri temperaturi od 210 °C, tlaku pare od 20 bara, vremenu zadržavanja od 1, 10 i 20 minuta i koncentracije natrijeve lužine od 2,0 %, dobivene su dvije faze – čvrsta (predobrađena pšenična slama) i tekuća faza. Udio glukana u predobrađenoj pšeničnoj slami iznosio je od 23,5 % do 80,31 %, ksilana od 1,64 do 24,76 %, arabinana 0,00 do 11,35 % i lignina od 0,23 % do 6,79 %.
2. Nakon alkalne predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru, pri temperaturi od 120°C, 160°C i 180°C i vremenu zadržavanja od 20 minuta i koncentraciji natrijeve lužine od 2,0 %, dobivene su dvije faze – čvrsta (predobrađena pšenične slama) i tekuća faza. Udio glukana u predobrađenoj pšeničnoj slami iznosio je od 60,02 % do 87,63 %, ksilana od 1,71 do 17,15 %, arabinana 1,63 % do 2,73 % i lignina od 2,40 % do 6,04 %.
3. Provođenjem alkalne predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri uvjetima temperature 180°C, tlaka od 8,5 bara, vremena zadržavanja od 20 min i koncentraciji NaOH od 2,0 %, dobiven je najveći udio glukana u predobrađenoj pšeničnoj slami i iznosio je 87,63 %. Udio glukana (celuloze) povećan je za 81 %, a postotak uklanjanja lignina iznosio je 83,40 % u odnosu na početnu sirovinu – pšeničnu slamu.
4. Enzimaska hidroliza predobrađene pšenične slame provedena je uz različite E/S omjere celulaze iz *A. niger* (2 %, 10 % i 20 %) te je utvrđeno da se uz E/S omjer od 20 % postiže najviši stupanj hidrolize. Nadalje, ispitan je utjecaj pH vrijednosti (pH 4,0 – 6,0) na stupanj hidrolize predobrađene pšenične slame te je pri pH vrijednosti od 5,0 jedinica postignut najviši stupanj hidrolize predobrađene pšenične slame. Dodatak β -glukozidaze iz *A. niger* (E/S omjer 2 %, 4 % i 8 %) povoljno utječe na stupanj hidrolize celuloze i hemiceluloze.
5. Bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T raste i proizvodi mliječnu kiselinu tijekom odvojene i simultane hidrolize i fermentacije predobrađene pšenične slame s komercijelnim celulazama iz *A. niger* u Erlenmeyer tikvicama pri 40°C i bez regulacije pH vrijednosti. Produktivnost procesa proizvodnje mliječne kiseline (Pr_{MK}) i maksimalni prinos mliječne kiseline tijekom odvojene hidrolize i fermentacije iznosi 0,16 g L⁻¹ h⁻¹ i 4,97 g L⁻¹. Tijekom simultane hidrolize i fermentacije Pr_{MK} (0,23 g L⁻¹) i maksimalni prinos mliječne kiseline

Zaključci

(6,74 g L⁻¹) su za 44 %, odnosno 36 % veći nego nakon procesa odvojene hidrolize i fermentacije.

6. Bakterija *L. amylovorus* DSM 20531^T raste i proizvodi mliječnu kiselinu tijekom odvojene i simultane hidrolize i fermentacije predobrađene pšenične slame s komercijalnim celulazama i uz dodatak β -glukozidaze iz *A. niger* u Erlenmeyer tikvicama pri 40°C i bez regulacije pH vrijednosti. Produktivnost procesa proizvodnje mliječne kiseline (Pr_{MK}) i maksimalni prinos mliječne kiseline tijekom odvojene hidrolize i fermentacije iznosi 0,15 g L⁻¹ h⁻¹ i 4,42 g L⁻¹. Tijekom simultane hidrolize i fermentacije Pr_{MK} (0,24 g L⁻¹) i maksimalni prinos mliječne kiseline (7,03 g L⁻¹) su za 60 %, odnosno 58 % veći nego nakon procesa odvojene hidrolize i fermentacije. Navedeni podaci ukazuju da dodatak β -glukozidaze povoljno utječe na prinos i produktivnost mliječne kiseline.

6. LITERATURA

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2011) Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *J. Biotechnol.* **156**, 286-301.

Anwar, Z., Gulfranz, M., Irshada, M. (2014) Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **7**(2), 163-173.

Anonymous 1, Shematski prikaz djelovanja procesa predobrade, <https://www.researchgate.net/profile/Xuebing_Zhao/publication/233915771/figure/fig2/AS:272573611114553@1441998022238/figure-1-Pre-treatment-of-lignocellulosic-biomass-for-enzymatic-hydrolysis-adapted-from.png>. Pristupljeno 3. Srpnja 2017.

Anonymous 2, <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.4&Suchword=&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=Aspergillus+niger&show_tm=0>. Pristupljeno 5. Srpnja 2017.

Ashok, P. (2009) Bioethanol from Lignocellulosic Biomass Part I Pretreatment 65 ft he Substrates, U: *Handbook of Plant Based Biofuels* (Ashok, P., ured.), Taylor & Francis, New York, str. 121-139.

Bajpai, P. (2016) Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, U: *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production* (Bajpai, P., ured.) Springer, Singapur, str. 17-57.

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

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

Literatura

Chen, H. (2014) Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose, U: *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice* (Chen, H., ured.), Chemical Industry Press, Kina, str. 25-69.

Chen, Y., Stevens, M. A., Zhu, Y., Holmes, J., Xu, H. (2013) Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnol. Biofuels*. **6**(8), 1-10.

De Man, J. D., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* **23**, 130-135.

Demirbas, A. (2005) Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energ. Source*. **27**, 327-337.

Demirbas, A. (2008) Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *J. Hazard. Mater.* **157**, 220-229.

Emptage M., Gray K. A., Zhao L. (2006) Bioethanol, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**(2), 141 – 146.

Hadar, Y. (2013) Sources for Lignocellulosic Raw Materials for the Production of Ethanol, U: *Lignocellulose Conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production* (Faraco, V., ured.), Springer, Njemačka, str. 21 – 38.

Hames, W.P., Hertel, C. (2009) Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901. 212AL. U: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **3**, 465–511.

Han, M., Moon, S., Kim, Y. (2009) Bioethanol production from ammonia percolated wheat straw, *Biotechnol Bioproc.* **14**, 606-611.

Han, L., Feng, J., Zhang, S., Ma, Z., Wang, Y., Zhang, X. (2012) Alkali pretreated of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Braz. J. Microbiol.* **40**(1), 53-61.

He, B.B., Van Gerpen, J.H., Morra, M.J., McDonald, A.G. (2016) Lipid based biorafinery. U: Bioenergy: Principles and Applications (Li, Y. , Khanal, S.K., ured.) Wiley-Blackwell, SAD str. 481-512.

Holladay, J. E., White, J. F., Bozell, J. J., Johnson, D. (2007) Top Value–Added Chemicals from Biomass–Volume II–Results of Screening for Potential Candidates from BiorefineryLignin (No. PNNL-16983). Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), Richland, Washington.

Jiang, T., Qiao, H., Zheng, Z., Chu, Q., Li, X., Yong, Q., Ouyang, J. (2016) Lactic acid production from pretreated hydrolysates of corn stover by a newly developed *Bacillus coagulans* Strain. *PloS ONE*, **11**(2), 1-13.

John, R. P., Nampoothiri, K. M., Pandey, A. (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 524-534.

Jonsson, J. L., Alriksson, B., Nilvebrant, N. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 1-16.

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

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

Knauf M., Moniruzzaman M. (2004) Lignocellulosic biomass processing. *Persp. Int. Sugar. J.* **106**, 147-150.

Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E., (2005) Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **124**, 1081–1099.

Literatura

Levan, S. L., Ross, R. J., Winandy, J. E. (1990) Effects of fire retardant chemicals on bending properties of wood at elevated temperatures. Research Paper FPL-RP-498. Madison, WI: U.S. Department of agriculture, Forest service, Forest Products Laboratory, str. 1-26.

Lopez, M. J., Vargas-Garcia, M.D., Suarez-Estrella F., Nichols, N.N., Dien, B.S., Moreno J. (2007). Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 794–800.

Mäki–Arvela, P., Salmi, T., Holmbom, B., Willför, S., Murzin, D. Y. (2011) Synthesis of Sugars by Hydrolysis of Hemicelluloses—A Review. *Chem. Rev.* **111**(9), 5638-5666.

Mousdale, D.M. (2008) Chemistry, Biochemistry and Microbiology of Lignocellulosic Biomass, U: *Biofuels: Biotechnology, Chemistry and Sustainable Development*, (Mousdale, D.M., ured.), Taylor & Francis, London, str. 49-95.

Mussatto, S. I., Texeria, J. A. (2010) Lignocellulose as raw material in fermentation processes U: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2 izd. (Mendez-Vilas, A., ured.), Formatex, Badajoz, Spain, str. 897-907.

Nakamura, L.K. (1981) *Lacto bacillus amylovorus*, a New Starch-Hydrolyzing Species from Cattle Waste-Corn Fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**(1), 56-63.

Neefs, J. M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chappele, S., De Watcher, R. (1993) Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Res.* **21**(13), 3025-3049.

Nigam, J. N. (2001) Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J. Biotechnol.* **87**, 17-27.

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

Özcelik, S., Kuley, E., Özogul, F. (2016) Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT – Food Sci. Technol.* **73**, 536-542.

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

Palmqvist, E., Hahn–Hagerdal, B. (2000b) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II : inhibition and detoxification. *Biores. Technol.* **74**, 25-33.

Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., Tenkanen, M., (2004) Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *J. Biotechnol.* **107**, 65–72.

Pandey, A., Soccol, R. C., Nigam, P., Soccol, T. V. (2000) Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Biores. Technol.* **74**, 69-80.

Pointner, M., Kuttner, P., Obrlik, T., Jäger, A., Kahr, H. (2014) Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. *Agron. Res.* **12**(2), 391–396.

Ragauskas A. (2014.), Materials for biofuels. *World Scientific.* 81-84.

Rattanachaikunsopon, P. i Phumkhachorn, P. (2010) Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their 69ft he69 food production. *Annals Biol. Res.* **1**, 218-228.

Rezić, T. (2012) Industrijska biotehnologija, Biotehnološka proizvodnja biogoriva, 1.izd., Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Rowell, R. M., Pettersen, R., Tshabalala, M. A. (2005) Cell wall chemistry. U: Handbook of wood chemistry and wood composites (Rowell, R. M., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 35-74.

Saha, B.C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**(5), 279–291.

Literatura

Saini, J.K., Saini, R., Tewari, L. (2015) Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *J. Biotech.* **5**, 337–353.

Saritha M., Arora A. (2012) Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. *Indian. J. Microbiol.* **52**, 122-130.

Schleifer, K. H., Amann, R. I., Ludwig, W. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.

Silversteina, R. A., Chena, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Boyette, M. D., Osborne J. (2008) A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks, *Biores. Technol.* **98**, 3000-3011.

Sjostrom E. (1993) Wood polysaccharides U: Wood chemistry: Fundamentals and applications, 2. Izd., Academic Press, San Diego, str. 54-70.

Slavica, A., Trontel, A., Jelovac, N., Kosovec, T., Šantek, B., Novak, S. (2015) Production of lactate and acetate by *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T in comparison with *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T, *J. Biotechnol.* **202**, 50-59.

Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.* **83**, 1-11.

Šuškovac, J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. *Disertacija*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.

Taherzadeh M., Karimi K.,(2007) Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review, *BioResources*, **2**, 472-499.

Tannock, G. W. (1983): Effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microbiota. U: „Human Intestinal Microflora in Health and Disease (Hentges, D.J., ured.) Academic Press, New York, str. 517-539.

Trontel, A., Baršić, V., Slavica, A., Šantek, B., Novak, S. (2010) Modelling the effect of different substrates and temperature on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T in batch process. *Food Technol. Biotechnol.* **48**(3), 352-361.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**(2), 407-438.

Varadarajan, S., Miller, D.J. (1999) Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids, *Biotechnol. Prog.* **15**, 845–854.

Von Sivers, N., Zacchi, G., Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B. (1994) Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Progr.* **10**, 555–560.

Wyman, C. E. (1996) Pretreatment of Biomass, U: *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, (Wyman, C.E., ured.), Taylor & Francis, London, str. 179-213 .

Walker, G. M. (2010) Bioethanol feedstocks, U: *Bioethanol: Science and Technology of Fuel Alcohol*, (Walker, G.M., red), 1. Izd., Bookboon, Danska, str. 31-59.

Winandy, J. E. (1995) Effects of fire retardant treatments after 19 months of exposure at 150F (66C). Res. Note FPL-RN-0264. U.S. Department of agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, WI., str. 13.

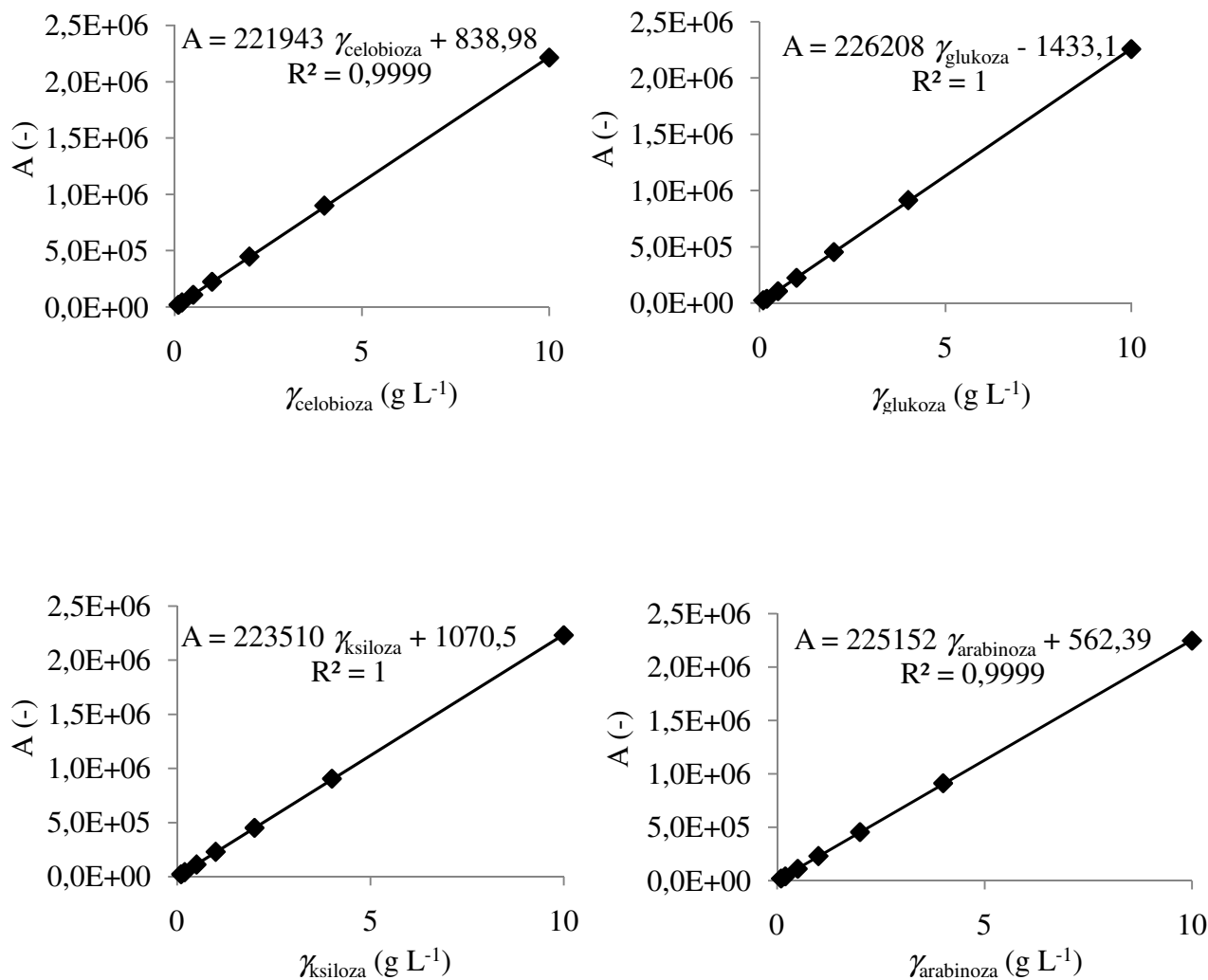
Zhang i Lynd (2015) Determination of the Number-Average Degree of Polymerization of Cellodextrins and Cellulose with Application to Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules.* **6**, 1510-1515.

7. PRILOZI

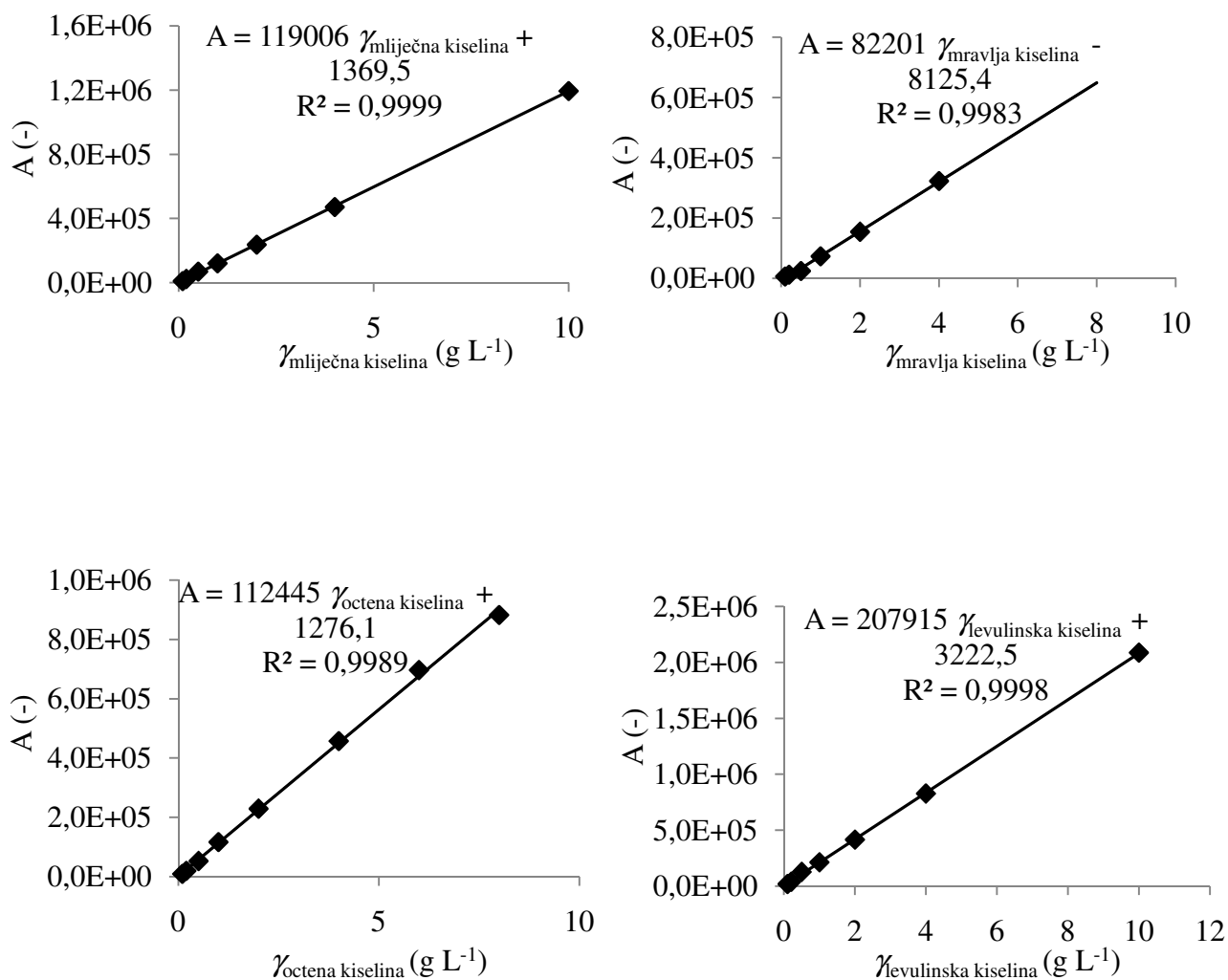
7.1. POPIS KRATICA

Oznaka veličine	Veličina	Jedinica
$t_{\text{FAZA RASTA}}$	faze rasta tijekom uzgoja	[h]
<i>lag</i>	lag faza rasta	[h]
<i>eksp</i>	eksponencijalna faza rasta	[h]
t_{UZ}	ukupno vrijeme uzgoja	[h]
r_{glc}	brzina potrošnje glukoze	[h ⁻¹]
μ_{m}	maksimalna specifična brzina rasta biomase	[h ⁻¹]
r_{MK}	brzina proizvodnje mliječne kiseline	[h ⁻¹]
\mathcal{M}_{MKm}	maksimalna koncentracija mliječne kiseline	[g L ⁻¹]
$Y_{\text{P/S}}$	koeficijent konverzije glukoze u mliječnu kiselinu	[g g ⁻¹]
Pr_{MK}	produktivnost proizvodnje mliječne kiseline	[g L ⁻¹ h ⁻¹]
<i>PS</i>	pšenična slama	
<i>PPS</i>	predobrađena pšenična slama	
<i>E/S</i>	omjer mase dodanog enzima po gramu supstrata	[%]
<i>ksi</i>	ksiloza	
<i>arab</i>	arabinoza	
t_{z}	vrijeme zadržavanja	[h]
BMK	bakterije mliječne kiseline	
MK	mliječna kislina	
OK	octena kislina	

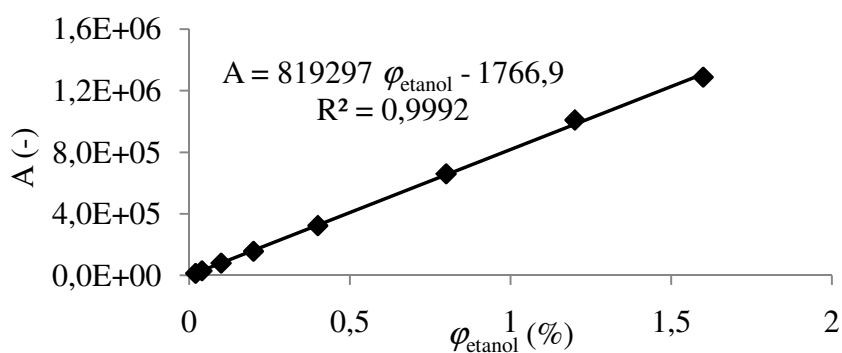
7.2. BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UGLJIKOHIDRATA I PROIZVODA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)



Slika 25. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije celobioze, glukoze, ksiloze i arabinoze.

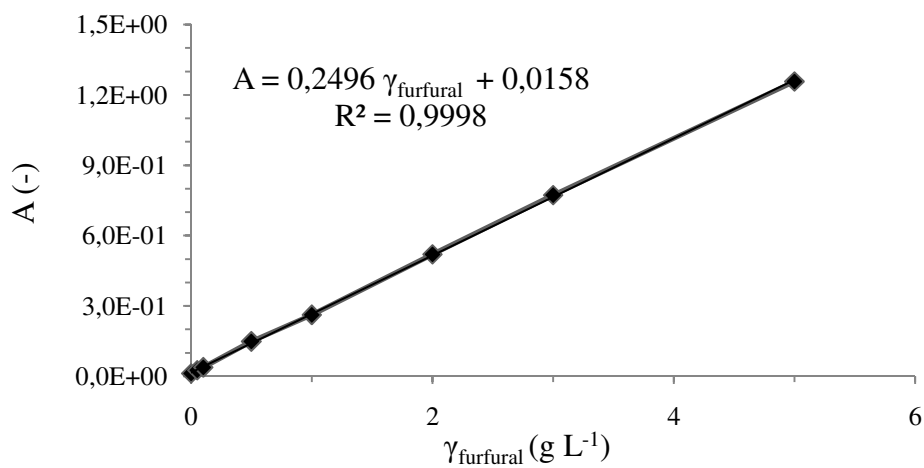


Slika 26. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije mliječne, mravlje, octene i levulinske kiseline.



Slika 27. Baždarni dijagram za određivanje volumnog udjela etanola.

7.3. BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FURANA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)



Slika 28. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije furana.