

# Predobrada jelove piljevine razrijeđenom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru

---

**Kelemen, Zora**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*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:159:938001>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Zora Kelemen**

7498/BT

**PREDOBRADA JELOVE PILJEVINE  
RAZRIJEĐENOM SUMPORNOM KISELINOM U  
VISOKOTLAČNOM REAKTORU  
ZAVRŠNI RAD**

**Znanstveno-istraživački projekt:** *"Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina" (OPB-SLS; HRZZ-9717)*

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

**Zagreb, 2019.**

*Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu u sklopu projekta "Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina" (OPB-SLS; HRZZ-9717) (voditelj projekta red. prof. dr. sc. Božidar Šantek).*

*Zahvaljujem svojoj mentorici red. prof. dr.sc. Vlatki Petravić Tominac na stručnoj pomoći i savjetima pri izradi ovog rada. Također zahvaljujem svim zaposlenicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, posebice doc.dr.sc. Antoniji Trontel, doc.dr.sc. Mariju Novaku, mag.ing. Nenadu Marđetku, dr.sc. Martini Andlar, mag.ing. Marini Grubišić, našem tehničkom osoblju Ljiljani Blažević, Marini V. Nućec i Igoru Livadi.*

*Zahvaljujem se djelatnicama Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo dr.sc. Bojani Voučko i univ. bacc. ing. Lidiji Drobac iz Laboratorija za kemiju i tehnologiju žitarica te mag.ing. Karli Hanousek Čiča iz Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca.*

*Također, veliku zahvalu dugujem kolegi Mariju Iliću na pomoći, suradnji, strpljenju i ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### PREDOBRADA JELOVE PILJEVINE RAZRIJEĐENOM SUMPORNOM KISELINOM U VISOKOTLAČNOM REAKTORU

*Zora Kelemen, 0058211725*

#### **Sažetak:**

Kao lignocelulozna sirovina u ovom radu je korištena jelova piljevina te je tretirana razrijeđenom sumpornom kiselinom (0.5% w/v) u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama (180°C, 200°C i 210°C) i vremenima zadržavanja (5, 10 i 15 minuta). Prikladnost pojedinih uvjeta predobrade procijenjena je obzirom na koncentracije šećera i inhibitora u dobivenim kiselinskim hidrolizatima. Najbolji sastav imao je hidrolizat dobiven pri temperaturi od 180°C uz vrijeme zadržavanja 5 minuta. Pritom je sastav hidrolizata bio slijedeći: glukoza (2.08g/L), manoza s primjesama ksiloze i galaktoze (7.17g/L), arabinoza (0.68g/L), topljivi lignin (0.20g/L), octena kiselina (6.86g/L), levulinska kiselina (0.03g/L) i furani (0.24g/L) dok mravlja kiselina nije detektirana. U svim primijenjenim uvjetima predobrade došlo je do razgradnje celuloze i jedini polisaharid detektiran u čvrstoj fazi bio je glukan. Kako bi se izbjegla prekomjerna razgradnja celuloze i nastajanje inhibitora, potrebno je provesti optimiranje predobrade primjenom blažih uvjeta hidrolize.

**Ključne riječi:** lignoceluloza, jelova piljevina, kiselinska predobrada, meko drvo

**Rad sadrži:** 49 stranica, 13 slika, 6 tablica, 63 literaturnih navoda, 8 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Mentor pri izradi:** mag. ing. bioproc. Nenad Marđetko

**Datum obrane:** 18. rujna 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Beer and malt technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

### **DILUTE ACID PRETREATMENT OF FIR SAWDUST IN A HIGH-PRESSURE REACTOR**

***Zora Kelemen, 0058211725***

#### **Abstract:**

In this thesis, fir sawdust was hydrolysed using dilute sulphuric acid (0.5%w/v) pretreatment in a high-pressure reactor at three different temperatures (180°C, 200°C i 210°C) and three residence times (5, 10 i 15 minutes). Adequacy of conditions was approximated with regards to sugar and inhibitor concentrations in the hydrolysates. The best results were recovered during a 5 minute pretreatment at 180°C. The composition of the obtained hydrolysates was as following: glucose (2.08g/L), manose with xylose and galactose admixture (7.17g/L), arabinose (0.68g/L), soluble lignin (0.20g/L), acetic acid (6.86g/L), levulinic acid (0.03g/L), furans (0.24g/L) while formic acid was undetected. In all pretreatment conditions cellulose was hydrolysed and the only polisaccharide detected in solid phase was glucan. To avoid redundant disintegration of cellulose and forming of inhibitors, the pretreatment should be optimized by applying milder conditions of hydrolysis.

**Keywords:** lignocellulose, fir sawdust, acid pretreatment, softwoods

**Thesis contains:** 49 pages, 13 figures, 6 tables, 63 references, 8 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD. Vlatka Petravić Tominac, Full professor*

**Technical support and assistance:** M.Sc. Nenad Marđetko

**Defence date:** September 18th 2019

# Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Lignocelulozne sirovine	3
2.1.1. Građa lignoceluloznih sirovina	4
2.1.1.1. Celuloza	4
2.1.1.2. Hemiceluloza	5
2.1.1.3. Lignin	6
2.1.1.4. Ekstraktivne tvari	7
2.1.1.5. Građa i sastav mekog drva	7
2.1.2. Predobrada	9
2.1.2.1. Fizikalna predobrada	11
2.1.2.2. Kemijska predobrada	11
2.1.2.3. Fizikalno-kemijska predobrada	12
2.1.2.4. Biološka predobrada	13
2.1.3. Inhibitori koji nastaju tijekom predobrade	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. Sirovina	16
3.1.2. Kemikalije	17
3.2. Oprema	18
3.2.1. Visokotlačni reaktor za termičku obradu lignoceluloznih sirovina	19
3.2.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC)	21
3.3. Metode	22
3.3.1. Predobrada lignoceluloznih sirovina	22
3.3.2. Analitičke metode	24
3.3.2.1. Usitnjavanje uzoraka	24
3.3.2.2. Određivanje udjela suhe tvari i pepela u čvrstim uzorcima	24
3.3.2.3. Ekstrakcija lignocelulozne sirovine po Soxhletu	25
3.3.2.3.1. Ekstrakcija vodom	25
3.3.2.3.2. Ekstrakcija etanolom	26
3.3.2.4. Kiselinska hidroliza lignocelulozne sirovine	27

3.3.2.5. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini	27
3.3.2.6. Udjel lignina topljivog u kiselini (LTK)	28
3.3.2.7. Određivanje furana spektrofotometrijski	28
3.3.2.8. Priprema uzoraka za analizu HPLC metodom	29
3.3.2.9. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC)	30
3.3.2.10. Izračunavanje udjela strukturnih ugljikohidrata	30
3.3.2.11. Izračunavanje iskorištenja glukana i manana s primjesama ksilana i galaktana	31
4. REZULTATI I RASPRAVA	33
4.1. Kemijski sastav sirovine	33
4.2. Sastav tekućih hidrolizata dobivenih predobradom	34
4.3. Sastav čvrste faze dobivene kiselinskom predobradom	39
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA	43
7. PRILOZI	49



## 1. UVOD

U zadnjih nekoliko desetljeća proveden je velik broj istraživanja na obnovljivim sirovinama za biotehnološku proizvodnju i izvorima energije s ciljem zamjene fosilnih goriva. Izgaranjem fosilnih goriva nastaje ugljikov dioksid koji je jedan od glavnih uzročnika globalnog zatopljenja. Lignocelulozne sirovine su jedan od obnovljivih izvora energije te njihovo izgaranje ne doprinosi povećanju CO<sub>2</sub> u atmosferi (Kumar i sur., 2009). Postoji mnogo mogućnosti njihovog korištenja, pa se danas najviše istraživanja provodi u svrhu optimizacije procesa iskorištenja lignoceluloznih sirovina za proizvodnju biogoriva, bioplina, bioetanola, organskih kiselina, enzima i mikrobne biomase kao i za mnoge druge biotehnološke procese (Alriksson, 2006).

Lignoceluloza je vrlo dostupna, jeftina i ne konkurira na tržištu hrane poput kukuruza i šećerne trske koji se mogu koristiti u svrhu dobivanja bioetanola i drugih kemikalija. Postoji više vrsta lignoceluloznih sirovina i to su: poljoprivredni ostaci (pšenični i kukuruzni oklasci), šumski otpad (meko i tvrdo drvo) te trave (Kumar i sur., 2009). U prirodi, lignoceluloza daje čvrstoću staničnoj stijenci i štiti biljke od mehaničkih oštećenja i bioloških napada (Karimi, 2015).

Lignoceluloza se sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina. Hidrolizom celuloze se oslobađa glukoza, a hidrolizom hemiceluloze oslobađaju se pentoze i heksoze. Navedene šećere radni mikroorganizmi mogu koristiti kao supstrat prilikom fermentacije. Hemiceluloza se zbog svoje strukture razgrađuje pri blažim uvjetima predobrade nego celuloza. Lignin čini zaštitni sloj oko hemiceluloze i celuloze i teško ga je razgraditi (Bajpai, 2016), a može se koristiti u proizvodnji goriva, ljepila i smola.

Metode predobrade lignoceluloznih sirovina dijele se na fizikalne, fizikalno-kemijske, kemijske i biološke (Brodeur i sur., 2011). Kiselinska hidroliza spada u kemijske metode predobrade lignocelulozne sirovine. Kiselina uzrokuje promjenu strukture lignina, hidrolizu hemiceluloze i amornog dijela celuloze. Predobrada je potrebna kako bi se povećala izloženost ugljikohidratnih polimera hidrolitičkim enzimima. Cilj predobrade lignoceluloze je uklanjanje lignina i smanjivanje kristaliničnosti celuloze (Alriksson, 2006; Taherzadeh i Karimi, 2008).

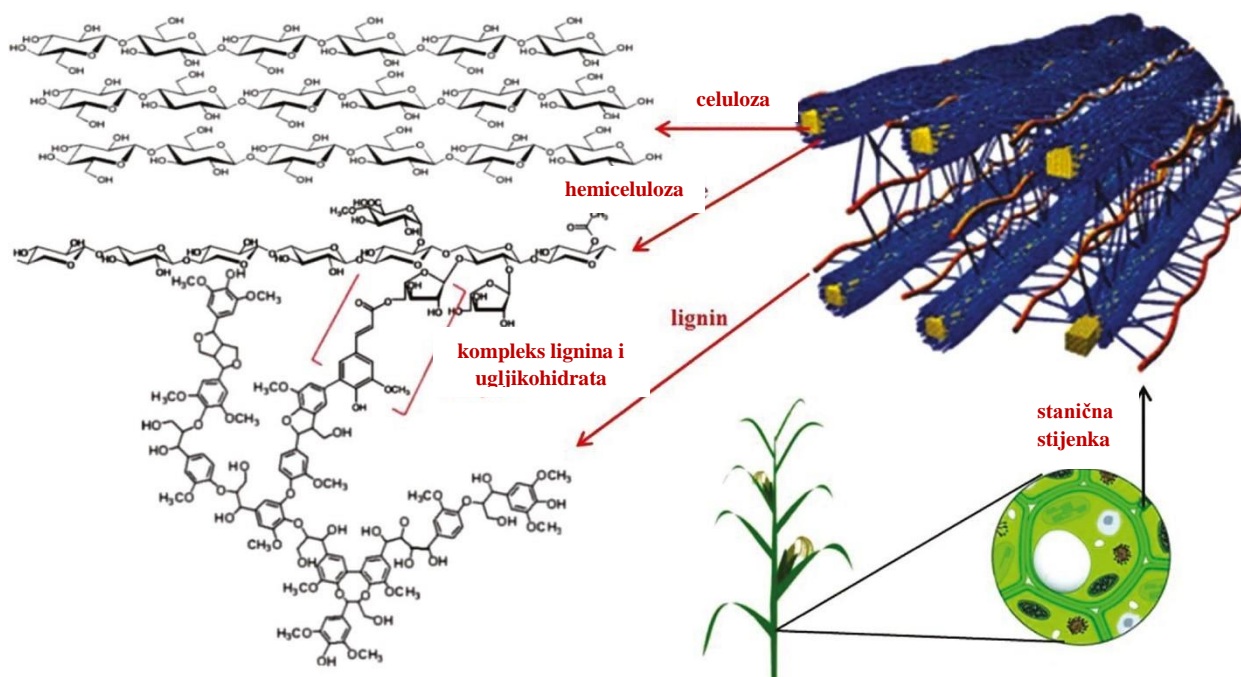
Svrha ovog završnog rada je istraživanje utjecaja vremena i temperature zadržavanja na uspješnost predobrade jelove piljevine razrijeđenom sumpornom kiselinom (0.5%w/v) u

visokotlačnom reaktoru. Odabrane su temperature zadržavanja bile 180°C, 200°C i 210°C te vremena zadržavanja od 5, 10 i 15 minuta. Sastav hidrolizata nastalih predobradom je analiziran te su doneseni zaključci o optimizaciji predtretmana kiselinom.

## 2. Teorijski dio

### 2.1. Lignocelulozne sirovine

Lignocelulozna biomasa podrazumijeva biljni materijal dobiven nakon prerade drva (npr. piljevina), poljoprivredne ostatke (npr. kukuruzni oklasci, slama) i industrijski otpad biljnog porijekla (npr. papirna pulpa). Organske tvari nađene u biljkama dijele se na polisaharide (celuloza, hemiceluloza i pektini), lignin i ekstraktivne tvari (Slika 1). Anorganske tvari čine pepeo (Da Silva Perez, 2010). Lignoceluloza je sastavni dio stanične stijenke biljnih stanica. Stanična stijenka daje čvrstoću biljkama te ih štiti od kemijskih, mikrobnih i mehaničkih oštećenja (Karimi, 2015), a sastoji se od celuloze, hemiceluloze i lignina. Udio pojedinih komponenata varira ovisno o vrsti biljke (trave, meko drvo, tvrdo drvo) te o dijelu biljke (korijen, deblo, granje). Više biljke imaju veće udjele lignina, a trave i niže biljke sadrže manje lignina (Azadi i sur., 2013). Celuloza i hemiceluloza se mogu hidrolizirati do fermentabilnih šećera dok se lignin ne može. Oslobođeni šećeri mogu se koristiti kao supstrat za rast mikroorganizama ili u proizvodnji biokemikalija i biogoriva.



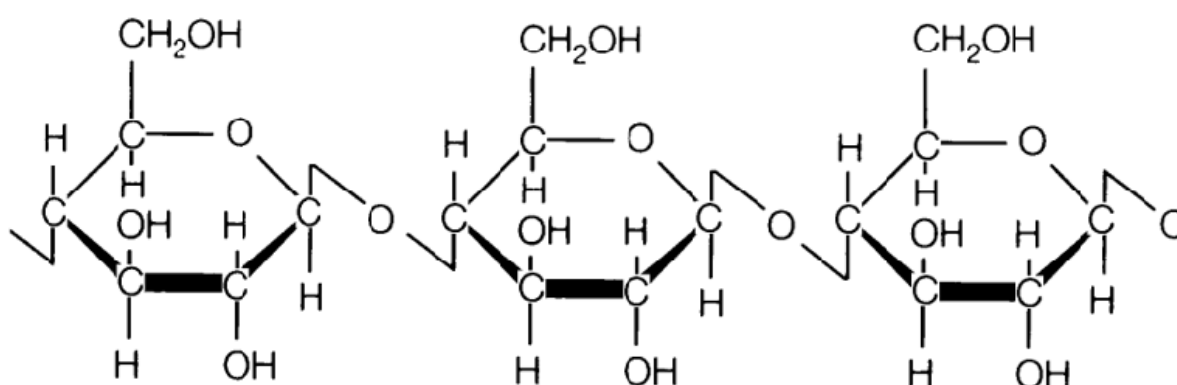
**Slika 1.** Sastav lignoceluloze (Volynets i sur., 2016).

### 2.1.1. Građa lignoceluloznih sirovina

Lignocelulozu čine tri polimera: celuloza (35-50%), hemiceluloza (15-35%) i lignin (10-35%) (Karimi, 2015). Celuloza i hemiceluloza su blisko povezane te zajedno s ligninom tvore trodimenzionalnu strukturu. Zbog strukture otporne na oštećenja potrebno je napraviti predtretman sirovine prije provođenja submerznog uzgoja.

#### 2.1.1.1. Celuloza

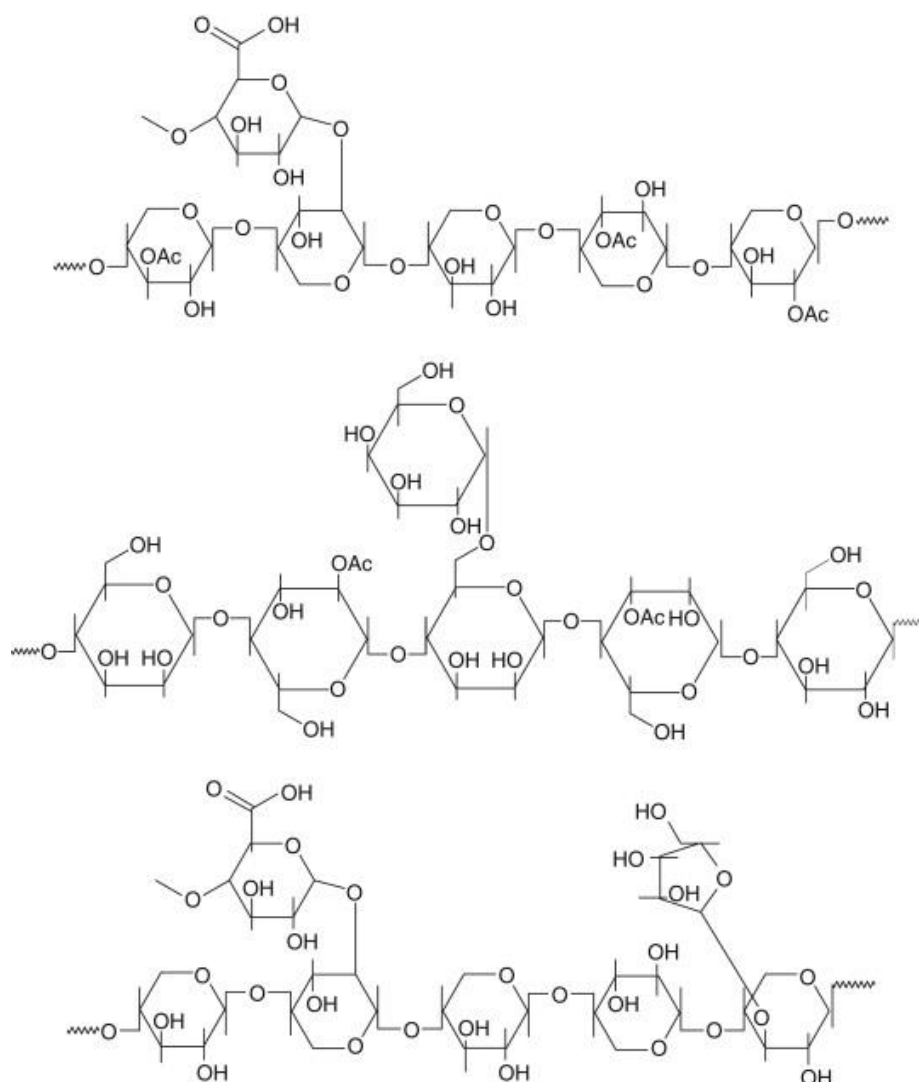
Celuloza je polisaharid sastavljen od ravnih lanaca D-glukoze. Glukoza je šećer od 6 ugljikovih atoma (heksoza). Jedan lanac čini 10000 ili više jedinica glukoze i stoga je celuloza homopolimer, u kojem su jedinice glukoze međusobno povezane  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom (Da Silva Perez, 2010). Prisutnost tri hidroksilne grupe na svakoj jedinici glukoze (Slika 2) omogućuju formiranje velikog broja vodikovih veza s drugim molekulama. Pomoću hidroksilnih grupa povezuju se slojevi celuloze. Slojeve celuloze pridržavaju Van der Waalsove sile te tvore kristaliničnu strukturu. Lanci celuloze su povezani u mikrovlakna, a mikrovlakna su povezana hemicelulozom i obavijena ligninom (Taherzadeh i Karimi, 2008). Kristalinična celuloza daje tvrdoću i čvrstoću materijalu, ali i fleksibilnost. Isto tako, kompaktna struktura onemogućuje dostupnost glukoze celulolitičkim enzimima i kemikalijama. Stoga se tijekom kiselnog predtretmana većinom hidrolizira amorfna celuloza i površina kristalinične celuloze (Da Silva Perez, 2010). Derivati celuloze mogu se koristiti u proizvodnji membrana, filmova i adsorbensa.



**Slika 2.** Kemijska struktura celuloze (Acharya i sur., 2012).

### 2.1.1.2. Hemiceluloza

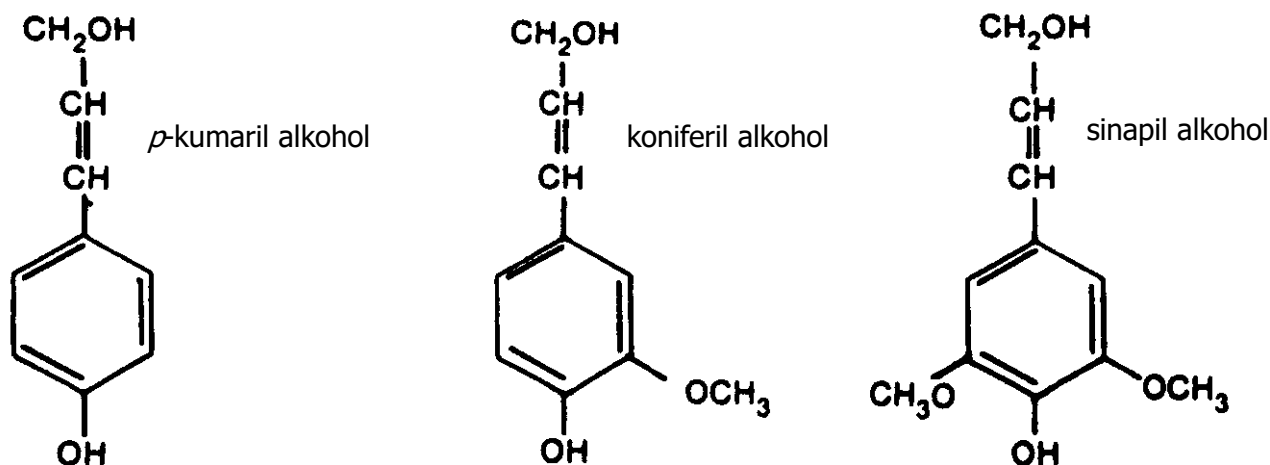
Uz celulozu, hemiceluloza čini ugljikohidratnu osnovu strukture drva. Visoko je razgranati heteropolimer (Slika 3.). Hidrolizom hemiceluloze dobiva se smjesa heksoza (glukoza, galaktoza, manoza) i pentoza (ramnoza, ksiloza, arabinoza). Hemiceluloza povezuje celulozu i lignin. Njezina amorfnu, razgranata struktura čini hemicelulozu vodotoplijivom od celuloze i lako se razgrađuje kiselinom hidrolizom do monomera (Tahezadeh i Karimi, 2008). Iz lignocelulozne sirovine može se ukloniti pomoću hemicelulaza, ali ako se koristi kiselinom predobrada onda nema potrebe za upotrebom enzima. Glavne komponente hemiceluloze mekog drva su galaktomanani i arabinoglukuronoksilan.



**Slika 3.** Struktura hemiceluloze (Gandini, 2013).

### 2.1.1.3. Lignin

Lignin je trodimenzionalni polimer koji se sastoji od fenilpropanskih jedinica sa hidroksi- i metoksi- skupinama (Slika 4). Lignin nastaje sintezom iz 3 alkohola: *p*-kumaril alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol. Lignin u mekih drva se sastoji pretežito od koniferil alkohola (Adler, 1997).



**Slika 4.** Monomeri koji čine lignin (Pettersen i sur., 1984).

Lignin doprinosi mehaničkoj čvrstoći i otpornosti biljaka na način da povezuje sve komponente lignocelulozne biomase te ju čini netopljivom u vodi (Bajpai, 2016). Njegova trodimenzionalna struktura je teško razgradiva te je blisko vezan na celulozne mikrofibrile (Avgerinos i Wang, 1983). Što je veća koncentracija lignina, lignoceluloznu sirovinu je teže enzimski i mehanički razgraditi. Meko drvo, u prosjeku, ima više lignina (Taherzadeh i Karimi, 2008). Smatra se da je prisutnost lignina glavni razlog za provođenje predtretmana. Lignin je bitna komponenta stanica ksilema jer omogućuje prijenos vode u žilama biljke, a hidrofobnost lignina štiti biljku od gubitka vlage i isušivanja (Karimi, 2015).

Prema Bajpai (2016) negativni utjecaji lignina na predtretman su:

- Nespecifična adsorpcija hidrolitičkih enzima
- Ometanje vezanja celulolitičkih enzima na kompleks lignina i ugljikohidrata
- Toksično djelovanje derivata lignina na rast mikroorganizama
- Predstavlja fizičku prepreku

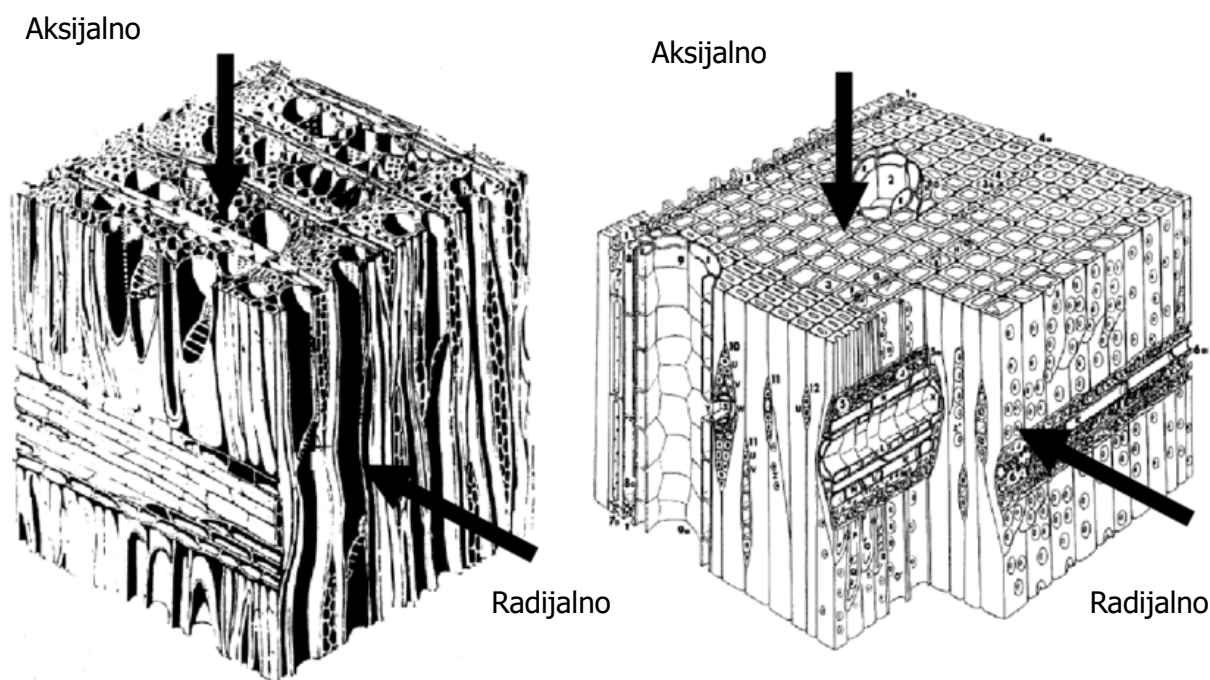
#### 2.1.1.4. Ekstraktivne tvari i pepeo

Ekstraktivne tvari drva su tvari koje ne pripadaju lignocelulozi. To su: smole, voskovi, alkaloidi, pektini, terpeni, škrob, glikozidi, esencijalna ulja i drugi spojevi. Ne sudjeluju u održavanju čvrstoće stanične stijenke, ali imaju ulogu u obrani od mikroorganizama ili su međuprodukti metabolizma drva. U prosjeku, ekstraktivne tvari čine 4-10% suhe tvari (Pettersen i sur., 1984).

Pepeo drva sadrži anorganske spojeve (minerale) te čini manje od 1% suhe tvari drva. Dobiva se izgaranjem, a određuje prije i poslije određivanja ekstraktivnih tvari.

#### 2.1.1.5. Građa i sastav mekog drva

Kemijskim analizama utvrđena je razlika između tvrdog drva (kritosjemenjače) i mekog drva (golosjemenjače) (Tablica 1) (Pettersen i sur., 1984). Na slici (Slika 5) može se vidjeti razlika u strukturi mekog i tvrdog drva.



**Slika 5.** Usporedba strukture tvrdog drva (lijevo) i mekog (desno) drva (Thunman i Leckner, 2002).



Uz glukozu, dominantni šećer mekog drva je manozna te se na nju nadovezuju jedinice galaktoze i glukoze. Kao što je prikazano u tablici (Tablica 2). Veliki udio tvrdog drva čini ksilan na kojeg su vezani arabinoza i glukuronska kiselina (Lešić, 2014).

**Tablica 1.** Usporedba kemijskog sastava polisaharida u različitim vrstama mekog i tvrdog drva (Da Silva Perez, 2010).

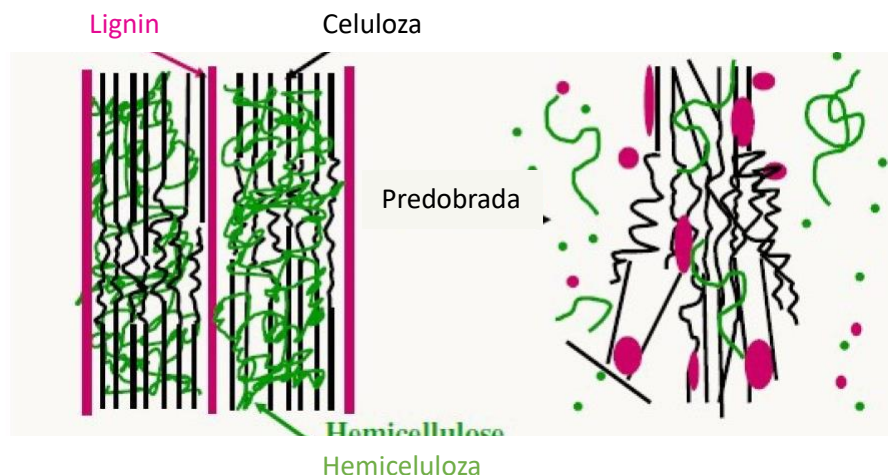
Vrsta drva	Udio lignina (%)	Udio ekstraktivnih tvari (%)	Udio polisaharida (%)	Udio heksoza (%)	Udio pentoza (%)
<b>Tvrdo drvo</b>					
Bukva	23.00	3.07	73.93	55.70	18.23
Breza	22.00	3.39	74.61	54.80	19.81
Kesten	23.70	16.14	60.16	46.79	13.37
<i>Eucalyptus globulus</i>	15.94	3.65	80.41	62.80	17.61
<i>Eucalyptus urograndis</i>	27.43	2.46	70.11	59.37	10.74
Hrast	23.50	13.26	63.24	49.48	13.76
Topola	26.00	3.96	70.04	56.79	13.25
<b>Meko drvo</b>					
Bijeli bor	25.90	3.75	70.35	61.98	8.37
Crni bor	26.10	5.28	68.62	63.40	5.22
Jela	26.10	3.31	70.59	64.00	6.59
Primorski bor	27.20	4.63	68.17	60.57	7.60
Visoka smreka	27.30	3.75	68.95	62.55	6.40
Obični bor	26.90	4.82	68.28	62.32	5.96

**Tablica 2.** Usporedba udjela šećera u polisaharidima različitih vrsta mekog i tvrdog drva (Da Silva Perez, 2010).

Vrsta drva	Udio glukoze (%)	Udio manoze (%)	Udio galaktoze (%)	Udio arabinoze (%)	Udio ksiloze (%)
<b>Tvrdo drvo</b>					
Bukva	71.91	2.61	0.82	0.54	24.11
Breza	70.07	2.49	0.90	0.40	26.14
Kesten	71.03	4.40	2.34	0.70	21.53
<i>Eucalyptus globulus</i>	74.50	2.28	1.32	0.60	21.31
<i>Eucalyptus urograndis</i>	82.08	1.50	1.10	0.23	15.09
Hrast	74.73	1.53	1.98	0.90	20.86
Topola	76.68	3.64	0.76	0.37	18.55
<b>Meko drvo</b>					
Bijeli bor	69.94	15.29	2.87	1.81	10.09
Crni bor	69.57	20.64	2.19	1.47	6.14
Jela	73.79	13.62	3.27	1.53	7.79
Primorski bor	69.44	15.33	4.09	1.95	9.18
Visoka smreka	71.28	16.82	2.61	1.38	7.90
Obični bor	69.48	18.79	3.00	1.58	7.15



### 2.1.2. Predobrada

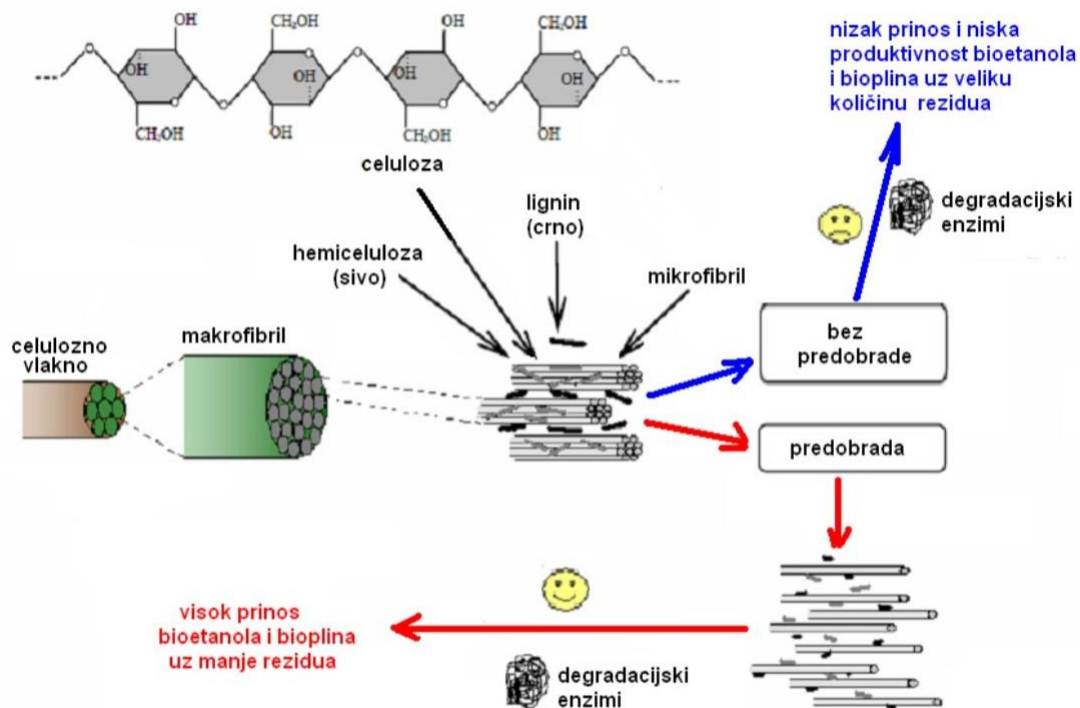


**Slika 6.** Pojednostavljeni prikaz utjecaja predobrade na lignoceluloznu biomasu (Mosier i sur., 2005).

Predobrada je postupak izmjene strukture lignoceluloznih sirovina čiji je cilj uklanjanje hemiceluloze i lignina te smanjenje kristaliničnosti celuloze (Slika 6). Uklanjanjem hemiceluloze i lignina povećava se površina celuloze koja je dostupna za razgradnju (Karimi, 2015). Dobivena celuloza se zatim može hidrolizirati kiselinama ili enzimski kako bi dobili glukozu. Puno veću efikasnost predobrade daje enzimska hidroliza jer ne nastaju nusprodukti te je cijepanje kemijskih veza specifično, ali su enzimi još uvijek preskupi. Zahtjevi za provođenje određene predobrade su: dobivanje šećera hidrolizom, izbjegavanje razgradnje i gubitaka ugljikohidrata, niska cijena te izbjegavanje nastanka inhibirajućih nusprodukata (Kumar i sur., 2017).

Čimbenici koji utječu na brzinu i efikasnost hidrolize lignoceluloznih sirovina su (Taherzadeh i Karimi, 2008):

- Dostupna površina celuloze i zaštićenost ligninom
- Stupanj polimerizacije celuloze
- Stupanj acetiliranja hemiceluloze
- Kristaliničnost celuloze



**Slika 7.** Učinci predtretmana na pristup enzima (Taherzadeh i Karimi, 2008).

Metode predobrade dijele se na:

- Fizikalne (piroliza, ekspanzija, ekstruzija, mljevenje )
- Kemijske (predobrada kiselinom, lužinom, organskim otapalima, ionskim tekućinama)
- Fizikalno-kemijske (mokra oksidacija, tretman parom, hidrotermoliza)
- Biološke (razgradnja gljivama i enzimima)

### 2.1.2.1. Fizikalna predobrada

Fizikalna predobrada temelji se na smanjenju dimenzija čestica s ciljem povećanja kontaktne površine između lignoceluloze i enzima. Prilikom procesa smanjuje se kristaliničnost celuloze (Bajpai, 2016). Nedostaci ovih metoda predobrade su varijacije u uspješnosti predobrade ovisno o sirovini te slabije uklanjanje lignina u usporedbi s ostalim metodama (Ivančić, 2016). Mljevenje je često korištena metoda, ali je njezina mana što zahtjeva veliku količinu energije.

### 2.1.2.2. Kemijska predobrada

Kemijska predobrada bazira se na uporabi kemijskih sredstva s ciljem hidrolize lignoceluloznih sirovina. Korištene metode su: kiselinska hidroliza, alkalna hidroliza, ozonoliza i oksidativna delignifikacija.

Predtretman kiselinom dijelimo prema korištenoj kiselini ( $H_2SO_4$ , HCl,  $HNO_3$ ) i koncentraciji kiseline. Koncentrirane kiseline (70% w/v) daju velike prinose (90%), ali su vrlo korozivne i štetne za okoliš. To zahtjeva korištenje skupe opreme koja je napravljena od materijala otpornog na koroziju te da bi proces bio isplativ kiselina bi se morala reciklirati (Kumar i sur., 2017). Razrijeđene kiseline su našle veću primjenu u industriji. Zbog niže koncentracije kiseline (<4% w/v) koriste se pri većim temperaturama i tlaku (10 atm) nego koncentrirane kiseline. Veće temperature (160-220°C) povećavaju vjerojatnost degradacije šećera i nastajanja inhibitora (Shahbazi, 2010). Prilikom hidrolize razrijeđenom kiselinom zbivaju se 2 kemijske reakcije. Prva reakcija je cijepanje celuloze u šećere, a druga prevodi šećere do inhibitora. Uvjeti koji pogoduju prvoj reakciji, uzorkuju degradaciju glukoze, a obje se reakcije događaju istovremeno (Shahbazi, 2010). Tijekom predobrade remeti se struktura lignina i dio lignina se otapa. Stoga celuloza postaje izloženiya i može se hidrolizirati enzimima (Yang i Wyman, 2004). Hemiceluloza se kiselinskom predobradom gotovo u potpunosti hidrolizira do jednostavnih ugljikohidrata. Acetilne jedinice oslobođene razgradnjom hemiceluloze daju octenu kiselinu koja je inhibitor rasta mikroorganizama. Lignin je komponenta lignoceluloze koja se najteže uklanja te se odvaja od celuloze pri temperaturama većim od 200°C (Palonen, 2004). Nedostatak kiselinske predobrade je potreba za neutralizacijom pomoću NaOH ili ispiranjem vodom prije fermentacije zbog vrlo niske pH-vrijednosti. Također, primjenom drugih metoda predobrade lignocelulozne sirovine ne dolazi do nastajanja inhibitora fermentacije. Detoksikacija tekuće faze od inhibitora provodi se adsorpcijom na aktivni ugljen, obradom kalcijevim hidroksidom, ionskom izmjenom ili rotacijskim vakum-uparivačem (Chandel i sur., 2011).

Alkalna hidroliza uzrokuje degradaciju esterskih i glikozidnih pobočnih ogranaka. Rezultat njihove razgradnje je promjena strukture lignina, bubrenje i djelomična dekrystalizacija celuloze te otapanje hemiceluloze (Brodeur i sur., 2011). Odvija se pri temperaturama (25-100°C) i tlakovima koji su niži nego kod drugih metoda predobrade. Posljedica blažih uvjeta je produljeno vrijeme trajanja hidrolize te sam proces često traje 24 sata. Kemikalije koje se koriste su natrijev, kalijev ili kalcijev hidroksid. Kalcijev hidroksid je jeftiniji od ostalih navedenih lužina i može se reciklirati (Kumar i sur., 2017). Tretman lužinom efikasnije odvaja lignin i hemicelulozu od celuloze u usporedbi s ostalim tretmanima. Korištenje lužine pokazalo se boljim za hidrolizu poljoprivrednih ostataka nego za drvo (Tahezadeh i Karimi, 2008). Kao i kod kiselinske hidrolize, prije enzimske hidrolize potrebna je neutralizacija pomoću CO<sub>2</sub> te detoksikacija (uklanjanje lignina i inhibitora) (Brodeur i sur., 2011).

Ozonoliza je efikasan tretman za degradaciju lignina i hemiceluloze. Odvija se pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku te ne dolazi do nastajanja inhibitora (Tahezadeh i Karimi, 2008). Isto tako, nakon procesa nije potrebna neutralizacija niti detoksikacija. Proces je vrlo skup jer su potrebne velike količine ozona.

Oksidativna delignifikacija se bazira na uklanjanju lignina pomoću vodikovog peroksida uz dodatak lužine. Uklanjanjem lignina povećava efikasnost enzima je se enzimi ne vežu nespecifično na lignin. Također, odstranjivanjem lignina bolja je dostupnost celuloze hidrolitičkim enzimima (Kumar i sur., 2017). Još jedna prednost ovog tretmana je što tijekom oksidativne delignifikacije nije zamijećeno nastajanje hidroksimetilfurfurala i furfurala (Tahezadeh i Karimi, 2008).

### **2.1.2.3. Fizikalno-kemijska predobrada**

Od fizikalno-kemijskih predtretmana najčešće se koristi eksplozija parom. U ovom procesu sirovina se prvo melje i obrađuje vodenom parom pod visokim tlakom na nekoliko minuta pri minimalno 160°C (Agbor i sur., 2011). Prilikom otpuštanja tlaka dolazi do eksplozivne dekompresije te transformacije hemiceluloze i lignina. Efikasnost eksplozije parom može se povećati dodatkom katalizatora poput CO<sub>2</sub> ili sulfatne kiseline. Primjena eksplozije parom nije u potpunosti primjenjiva na meka drva zbog povećanog udjela lignina pa je nužno koristiti kiselinu kao katalizator (Bajpai, 2016). Druge, slične, metode fizikalno-kemijskih predtretmana su tretman vrućom vodom i eksplozija vlakana amonijakom.

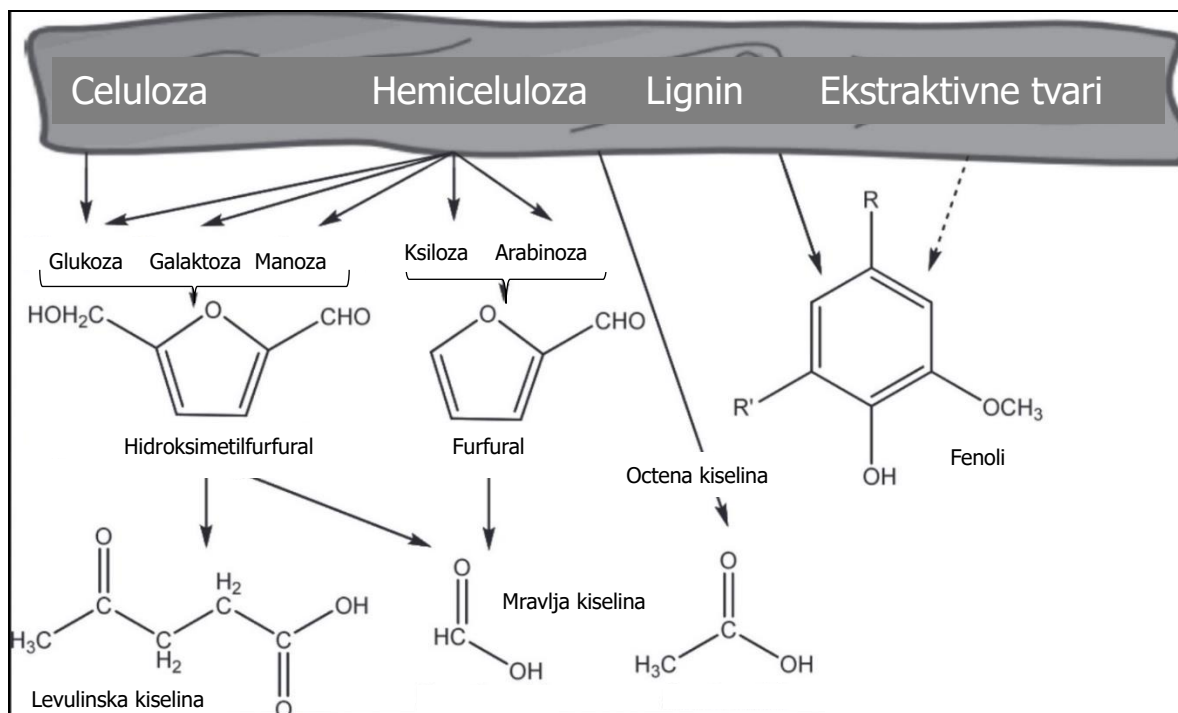
#### **2.1.2.4. Biološka predobrada**

Biološka predobrada lignocelulozne sirovine uključuje korištenje mikroorganizama koji degradiraju lignin i hemicelulozu, a celulozu ostavljaju intaktnom (Sánchez, 2008).

Predobrada se bazira na hidrolizi lignoceluloze enzimima mikroorganizama. Najčešći radni mikroorganizmi su gljive bijelog, smeđeg i mekog truljenja. Gljive bijelog truljenja mogu razgraditi lignin do CO<sub>2</sub> (Sánchez, 2008). Ovakva se predobrada odvija pri blagim uvjetima i nije skupa, ali dugo traje jer je brzina hidrolize sporija (Sun i Cheng, 2002).

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

Osim šećera, kiselinskom hidrolizom nastaje i veći broj nusproizvoda razgradnje hemiceluloze i lignina (Slika 8). Mnogi od njih su toksični za rast mikroorganizama i negativno utječu na fermentaciju (Mussatto i Roberto, 2003). Tri su skupine inhibitora: derivati furana, fenoli i organske kiseline. Ovi inhibitori smanjuju enzimsku aktivnost, oštećuju DNA te inhibiraju sintezu proteina i RNA (Hsu i sur., 2010). Njihov stupanj inhibicije ovisi o broju metilnih grupa koje posjeduju. Furfural je kemijski spoj koji nastaje degradacijom pentozna (ksiloza, arabinoza) iz hemiceluloze tijekom kiselinske predobrade. Na sobnoj temperaturi uljasta je tekućina koja pri doticaju sa zrakom postane svijetlo žute boje. Nastaje reakcijama dehidracije uz sumpornu kiselinu kao katalizator (Karimi, 2015). Iako sam mehanizam inhibicije metabolizma kvasca nije poznat, smatra se da furfural inhibira enzime glikolize (heksokinaza, fosfofruktokinaza) (Kumar i sur., 2017).



**Slika 8.** Shema nastajanja inhibitora (Jönsson i sur., 2013).

Levulinska kiselina posredno nastaje dehidracijom heksoza (Trajano, 2013). Tom reakcijom stvara se hidroksimetilfurfural koji se raspada na levulinsku i mravlju kiselinu. Mravlja kiselina također nastaje razgradnjom furfurala. Toksični učinak kiselina na *S. cerevisiae* može se pripisati njihovom nedisociranom obliku i tako da je octena kiselina najmanje štetna, zatim levulinska, a najštetnija za rast mikroorganizama je mravlja kiselina (Jönsson i sur., 2013). Mravlja kiselina je jači inhibitor od levulinske i octene zbog manje veličine molekule. To omogućuje bolju difuziju kroz staničnu membranu te dolazi do zakiseljavanja citoplazme i smrti stanice. Male nedisocirane kiseline mogu pasivno difundirati kroz staničnu stijenku i membranu u citosol dok disocirane kiseline ne mogu pasivno ući u stanicu u većim količinama. Sa padom pH-vrijednosti izvan stanice, kemijska ravnoteža se pomiče prema nastajanju nedisocirane kiseline i dolazi do povećanja difuzije. Difuzijom nedisociranog oblika kiseline spušta se pH-vrijednost unutar stanice. Aktivnim transportom stanica može ukloniti disocirane kiseline, a ATPaza može odstraniti vodikove ione koji su odgovorni za spuštanje intracelularnog pH. Za taj transport molekula stanica troši energiju molekula ATP-a. Nedostatak molekula ATP-a ograničava druge energetski zahtjevne procese (rast i održavanje metabolizma) u stanici i stanica konačno umire (van der Pol, 2014).

Nakon kiselinske predobrade, octena kiselina je najzastupljenija organska kiselina te nastaje hidrolizom acetilsilana iz hemiceluloze (Shahbazi, 2010). Hidroksimetilfurfural tijekom predtretmana nastaje degradacijom heksoza. Ovaj spoj ima vrlo visok potencijal za

daljnju pretvorbu u goriva, smole, veziva, otapala i farmaceutike (Peng i sur., 2011). Nastajanje hidroksimetilfurfurala odvija se u dva koraka uz pomoć katalizatora. Konverzija započinje izomerizacijom glukoze u fruktozu, a zatim se fruktoza izomerizira u hidroksimetilfurfural (Karimi, 2015). Koncentracije furfurala iznad 5 g/L i hidroksimetilfurfurala iznad 8 g/L pokazuju jako inhibicijsko djelovanje te koncentracije mravlje kiseline iznad 10 g/L i octene kiseline iznad 15 g/L (van der Pol, 2014).

### 3. Eksperimentalni dio

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Sirovina

Lignocelulozna sirovina korištena u ovom radu je jelova piljevina (Slika 9).

Pomiješana je piljevina dobivena s dvije različite lokacije (prva pošiljka od 4,7 kg s područja sjeverozapadne Hrvatske i druga pošiljka od 1,5 kg s područja Gorskog Kotara). Nakon primitka, sirovina je u tankom sloju raširena radi sušenja i ostavljena dva tjedna pri sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje i prevrtanje.



**Slika 9.** Izgled korištene jelove piljevine (vlastita fotografija).



### 3.1.2. Kemikalije

Kemikalije korištene u ovom radu navedene su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Kemikalije korištene u istraživanju.

<b>Naziv</b>	<b>Proizvođač</b>
Sumporna kiselina	Carlo Erba Reagents, Francuska
Fosfatna kiselina	Fluka, Njemačka
Furfural	Sigma-Aldrich, Njemačka
Cinkov sulfat heptahidrat	Merck, Njemačka
Kalcijev hidroksid	Kemika, Hrvatska
Demineralizirana voda	Vlastito postrojenje za demineralizaciju vode

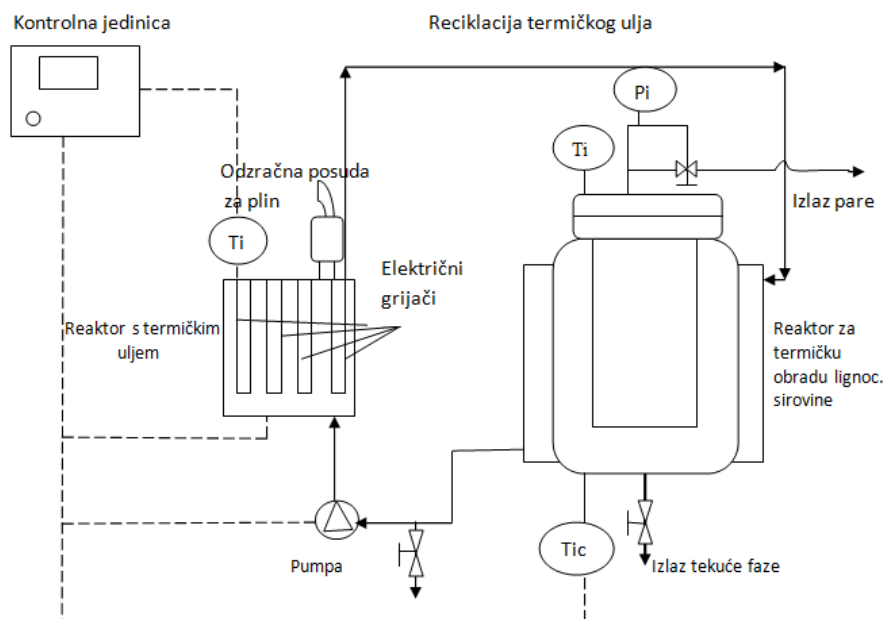
Za uklanjanje ekstraktivnih tvari topljivih u vodi, korištena je demineralizirana voda iz vlastitog postrojenja. Preostale ekstraktivne tvari izdvojene su pomoću etanola volumnog udjela 96% (Medika, Hrvatska).

### 3.2. Oprema

- **Vage**
  - digitalna vaga Acculab ALC-210.4 (Max. 210 g, d=0.1mg), Sartorius, Njemačka
  - tehnička vaga Tehnica ET-1111, Slovenija.
- **Mufolna peć**
  - mufolna peć Iskraterm IP-08.
- **Centrifuga**
  - HC-240, Tehnica, Železniki, Slovenija.
- **Termostat**
  - termostat „Sutjeska“ i ST-05, Instrumentaria, Hrvatska.
- **Za ekstrakciju vodom i etanolom**
  - aparatura po Soxhlet-u s odgovarajućim grijačem (Inako, Zagreb, Hrvatska), TIP: SK<sub>2KS</sub>, Br: 8734, V: 220, W: 800) i celulozni tuljci za ekstrakciju MN 645 30/33 × 90 mm (Macherey-Nagel GmbH Co KG, Njemačka).
- **Rotacijski-vakuum uparivač:**
  - Rotavapor Büchi R-215 (BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska) s vakuum kontrolerom V- 850, vakuum pumpom V-700 i vodenom kupelji (Heating Bath B-49).
- **UV/Vis spektrofotometar**
  - korišten je uređaj Cary Series UV-Vis Spectrophotometer (Agilent Technologies, SAD), a mjerenja su provedena u kvarcnim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka).
- **Za usitnjavanje čvrstih uzorka**
  - mlinac za kavu SCG 3050SS Sencor, Japan
  - kriomlin CryoMill (Retsch, Njemačka).
- **Za čuvanje uzoraka**
  - hladnjak i zamrzivač tvrtke Bosch (Njemačka).

### 3.2.1. Visokotlačni reaktor za termičku obradu lignoceluloznih sirovina

Na Slici 10a je prikazana shema visokotlačnog reaktora koji je korišten za obradu lignocelulozne sirovine razrijeđenom sumpornom kiselinom. U reaktoru ukupnog volumena 20 litara nalazi se perforirana košara u koju se stavlja lignocelulozna sirovina. Reaktor se grije preko plašta kroz koji struji termičko ulje koje se grije u odvojenoj posudi uz pomoć tri električna grijača. Strujanje zagrijanog ulja kroz cijeli sustav uz jednolično zagrijavanje smjese preko plašta reaktora omogućava integrirana pumpa. Reaktor sadrži temperaturne sonde za određivanje temperature ulja za grijanje te temperaturne sonde za određivanje temperature u gornjem i donjem dijelu reaktora te tlaka u gornjem dijelu reaktora (tlak para). Otvaranjem ventila za paru po završetku procesa, postepeno se ispušta para iz reaktora. Kada se tlak u reaktoru izjednači s atmosferskim tlakom, otvara se ventil za ispuštanje tekućeg dijela hidrolizata na dnu reaktora. Čvrsti dio zaostaje u perforiranoj košari koja se može izvaditi nakon otvaranja poklopca reaktora.



**Slika 10a.** Shema visokotlačnog reaktora za obradu lignoceluloznih sirovina (Ti-temp. pare/ulja; Pi-tlak pare u reaktoru; Tic-temperatura unutar reaktora).



**Slika 10b.** Fotografija visokotlačnog reaktora za obradu lignoceluloznih sirovina.

### 3.2.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC)

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



**Slika 11.** HPLC-uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (Grubišić, 2017).

Za filtraciju uzoraka (tekuća faza nakon predobrade sirovine, hidrolizati sirovine i čvrste faze dobivene predobradom) korišteni su najlonski filtri (Filteri za špricu najlon 0,22 $\mu$ m 25mm Spheros PK/50, LLG Labware).

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Predobrada lignocelulozne sirovine

Kiselinska predobrada sirovine razrijeđenom sumpornom kiselinom provedena je u visokotlačnom reaktoru (Slika 10a,b).

Eksperiment je postavljen tako da je početni omjer čvrste i tekuće faze (eng. solid-to-liquid ratio, SLR) iznosio 1:20 (1 g suhe tvari jelove piljevine na 20 mL razrijeđene kiseline). Izraženo na drugi način, kao omjer tekuće i čvrste faze (eng. liquid-to-solid ratio, LSR) to je 20:1 (20 mL razrijeđene kiseline na 1 g suhe tvari jelove piljevine). Odvagano je 500 g suhe tvari, što odgovara masi od 555,3 g jelove piljevine (koja sadrži 90,03 % suhe tvari) i stavljeno u košaru reaktora.

Sirovini je dodano 10 L prethodno pripravljene razrijeđene sumporne kiseline (0,5 % w/v), koja je sadržavala ukupno 9971 mL vodovodne vode i 28,3 mL koncentrirane sumporne kiseline. Radi lakšeg rukovanja velikim volumenom tekućine, prije ulijevanja u reaktor je razrijeđena kiselina pripravljena u dva obroka od 5L (u 4986 mL vodovodne vode dodano je po 14,15 mL koncentrirane sumporne kiseline).

Predobrade (Tablica 4) su provedene pri temperaturama 180°C i 200°C uz vrijeme zadržavanja od 5, 10 i 15 minuta, a pri temperaturi od 210°C su ispitivana vremena zadržavanja od 5 i 10 minuta.

**Tablica 4.** Plan eksperimenta predobrade jelove piljevine u visokotlačnom reaktoru razrijeđenom sumpornom kiselinom (0,5 % w/v).

		Temperatura zagrijavanja [°C]		
		180	200	210
Vrijeme zadržavanja [min]	5	+	+	+
	10	+	+	+
	15	+	+	-

Kada je postignuta željena temperatura predobrade i isteklo ispitivano vrijeme zadržavanja, para je postupno ispuštena sve dok tlak u reaktoru nije izjednačen s atmosferskim tlakom. Tada je tekuća faza ispuštena u prihvatnu posudu, a poklopac reaktora je otvoren. Osim tekuće faze, u prihvatnu posudu je ispušten i dio čvrste faze koja je prošla kroz perforaciju košare. Taj dio čvrste faze smatra se gubitkom.

Staklenom menzutom od 2 L izmjeren je volumen tekuće faze, pri čemu je tekuća faza odvojena od čvrste faze. U tri polipropilenske Falcon kivete od 50 mL uzet je uzorak bistre tekuće faze. Kratko nakon provođenja procesa određena je koncentracija topljivog lignina (TL) i ukupnih furana u tekućoj fazi, a ostatak uzorka je zamrznut za kasniju analizu šećera i inhibitora kako je opisano u Poglavlju 3.3.2.9. Oko 2,75 L tekuće faze pohranjeno je u plastične boce i ostavljeno bez neutralizacije na sobnoj temperaturi za kasnije eksperimente fermentacije. Preostali dio tekuće faze je odbačen.

Čvrsta faza dobivena obradom sirovine izvađena je iz košare i ohlađena u tankom sloju na aluminijskoj foliji, a zatim je odvagana. Otprilike 20 do 30 g uzorka čvrste faze odvojeno za analizu i odvagano na analitičkoj vagi, isprano vrućom vodom na Büchnerovom lijevku do neutralne reakcije, a potom je prebačeno u papirnate lađice i osušeno u sušioniku. Ostatak čvrste faze nakon hlađenja i vaganja prebačen je u vrećice bez prethodne neutralizacije i zamrznut u manjim obrocima radi kasnijih istraživanja.

Osušeni uzorci usitnjeni su u mlincu za kavu ili pomoću kriomlina i potom korišteni za dvostupanjsku hidrolizu koja prethodi određivanju šećera te topljivog i netopljivog lignina. Izračunata je suha tvar u uzetom uzorku, te ukupna suha tvar čvrste faze preostale u košari.

### 3.3.2. Analitičke metode

Uspoređeni su udjeli polisaharida te topljivog i netopljivog lignina u sirovini prije predobrade, a u čvrstom ostatku poslije predobrade razrijeđenom sulfatnom kiselinom.

#### 3.3.2.1. Usitnjavanje uzoraka

Uzorci početne sirovine usitnjeni su pomoću mlinca za kavu. Ovako samljeveni uzorci su ručno prosijani kroz sito veličine 1 mm. Nakon toga se pristupilo kemijskim analizama.

#### 3.3.2.2. Određivanje udjela suhe tvari i pepela u čvrstim uzorcima

Analiza suhe tvari i pepela provedena je za svaki uzorak u tri paralele (Mousdale, 1997; Sluiter i sur., 2012).

Udio pepela u čvrstim uzorcima određen je tako da su porculanski lončići najprije žareni u mufolnoj peći (550 °C/ 5 h), ohlađeni u eksikatoru i odvagani na 4 decimale. Zatim je u njih odvagano oko 1 g uzorka, koji je potom osušen pri 105 °C do konstantne mase, ohlađen u eksikatoru i odvagani. Iz razlike masa izračunat je udio suhe tvari po formuli [1].

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

Odvagani uzorci u lončićima su zatim karbonizirani na plameniku, a potom žareni u mufolnoj peći (550 °C/ 5 h) do bijelog pepela te ohlađeni u eksikatoru i izvagani. Postotak pepela u uzorku izražen je na suhu tvar.



### 3.3.2.3. Ekstrakcija lignocelulozne sirovine po Soxhletu

Prije analize lignina i šećera uzorci sirovine (jelova piljevina) podvrgnuti su najprije vodenoj, pa potom i etanolnoj ekstrakciji u aparaturi po Soxhletu, u skladu sa standardnim metodama za određivanje sastava biomase koje preporuča NREL (Sluiter i sur., 2005b; NREL, 2015). Pritom su primijenjeni ekstrakcijski uvjeti koje je za kukuruzne oklaske optimirala Korunek (2015), što znači 8 sati vodene ekstrakcije i 24 sata etanolne ekstrakcije.

Uzorci za ekstrakciju, koji su sadržavali manje od 10% vlage, usitnjeni su do odgovarajućih dimenzija čestica i odvagani su u brojevima označene celulozne tuljce za ekstrakciju, a na vrh je stavljena vata. Da bi kasnije što točnije preračunali rezultate, vaganje je provedeno istodobno kad i analiza suhe tvari. U tuljac za ekstrakciju odvagan je uzorak sirovine na 4 decimale (4,7241 g uzorka izvorne sirovine usitnjene u kriomlinu). Pritom se pazilo da tuljci budu napunjeni do polovice ili manje i uzeto je u obzir bubrenje (tako da visina uzorka u tuljcima bude ispod razine prelijevne cijevi.

#### 3.3.2.3.1. Ekstrakcija vodom

U prihvatnu tikvicu za ekstrakciju dodano je 190 mL destilirane vode, uključen je grijač i puštena je voda kroz hladilo. Vrijeme ekstrakcije (8 h) je mjereno od početka vrenja. Nakon 8 h ekstrakcija je prekinuta te su nakon hlađenja na sobnu temperaturu privremeno izvađeni tuljci da bi se u potpunosti iz aparature uklonio vodeni ekstrakt. Cjelokupni vodeni ekstrakt je prebačen u odmjernu tikvicu od 200 mL, pri čemu se pazilo da se aparatura ispere destiliranom vodom koja je također prebačena u odmjernu tikvicu.

Odmjerna tikvica je dopunjena do oznake, a od dobivenih 200 mL razrijeđenog ekstrakta uzeto je 3 puta po 10 mL za određivanje masenog udjela i masene koncentracije suhe tvari u vodenom ekstraktu. Tri Petrijeve zdjelice su osušene (105 °C/2h), ohlađene u eksikatoru i odvagane, a potom je u svaku od njih dodano po 10 mL vodenog ekstrakta koji je također odvagan. Otvorene Petrijeve zdjelice su stavljene na nekoliko sati u termostat da bi pri temperaturi oko 80 °C isparila sva voda. Potom su uzorci do kraja osušeni (105 °C/2h), ohlađeni u eksikatoru i izvagani. Iz mase ekstrakta izračunati su maseni udio i masena koncentracija ekstrakta u otopini. Iz masene koncentracije ekstrakta i ukupnog volumena ekstrakta (200 mL) izračunata je masa ukupnog ekstrakta izdvojenog iz odvaganog uzorka. Ona je dalje preračunata u maseni udio vodenog ekstrakta sirovini, koji je izražen na suhu tvar i na polaznu masu sirovine.

Nakon izdvajanja vodenog ekstrakta, tuljci su vraćeni na isto mjesto u aparaturu kako bi se mogla nastaviti ekstrakcija etanolom.

#### **3.3.2.3.2. Ekstrakcija etanolom**

U aparaturu u koju su vraćeni tuljci s uzorcima dodano je 190 mL etanola (96 % v/v) i provedena je ekstrakcija u trajanju 24 h. Nakon toga aparatura je ostavljena da se hladi do sobne temperature te je iz ohlađenog ekstraktora izvađen uzorak, a cijeli ekstrahirani materijal je prebačen na celulozni filter papir u Büchnerov-om lijevku. Nakon odvajanja tekuće faze čvrsti materijal je ispran sa 100 mL svježeg etanola (96 % v/v) i ostavljen da se osuši na Büchnerov-om lijevku i da vakuum povuče što je više moguće ekstrakta iz čvrstog uzorka. Filtrat dobiven ispiranjem spojen je s ekstraktom iz prihvatne tikvice.

Sav alkoholni ekstrakt iz ekstraktora i filtrata s Buchnerovog lijevka prebačeni su zajedno u posebnu tikvicu (50 mL) namijenjenu za korištenje na rotacijskom vakuum-uparivaču koji je primijenjen za uklanjanje etanola iz alkoholnih ekstrakata. Temperatura vodene kupelji rotacijskog vakuum-uparivača bila je pritom podešena na  $40 \pm 5$  °C. Tijekom upravljanja bilo je potrebno iznimno paziti na uvjete rada (temperatura i vakuum) jer je dolazilo do jakog pjenjenja. Kad se volumen u tikvici dovoljno smanjio, sadržaj je prebačen u manju tariranu tikvicu (50 – 100 mL) u kojoj je uparavanje provedeno do kraja. Nakon uparavanja tikvica je stavljena na sušenje pri  $40 \pm 2$  °C tijekom 24 sata. Nakon toga je ohlađena na sobnu temperaturu u eksikatoru i izvagana na 4 decimale. Izračunat je udio etanolnog ekstrakta izdvojenog nakon različitih vremena ekstrakcije i izražen na suhu tvar i na polazni uzorak.

Nakon ekstrakcije etanolom, čvrsti uzorak se može sušiti na zraku (ili eventualno pri 45 °C). Osušena ekstrahirana sirovina spremljena je u odgovarajuće bočice i kasnije korištena za analize.

#### **3.3.2.4. Kiselinska hidroliza lignocelulozne sirovine**

Udjel strukturnih ugljikohidrata (glukan, manan s primjesama ksilana i galaktana, arabinan) te lignina topljivog i netopljivog u kiselini određeni su u izvornoj, ekstrahiranoj i predobrađenoj lignoceluloznoj sirovini, a prva faza tijekom tih analiza je dvostupanjska kiselinska hidroliza prema propisu Nacionalnog laboratorija za obnovljive izvore energije (eng. National Renewable Energy Laboratory, NREL; Sluiter i sur., 2010). Uzorak koji je prethodno osušen i usitnjen u fini prah pomoću mlinca za kavu ili kriomlina odvagan je u tikvicu s okruglim dnom na analitičkoj vagi (oko 0,4 g suhe tvari uzorka).

Zatim je dodano 4 mL sumporne kiseline (72 % w/w) i ostavljeno u termostatu (30 °C / 1sat) uz povremeno miješanje staklenim štapićem. Potom je dodano 112 mL demineralizirane vode, čime je koncentracija sumporne kiseline u smjesi smanjena na 4 % (w/w). Tikvica je pričvršćena na povratno hladilo te je njezin sadržaj zagrijan do vrenja i potom kuhan i 4 sata uz povremeno miješanje. Nakon hidrolize uzorci su ohlađeni pod mlazom vode i filtrirani preko Büchnerovog lijevka kroz prethodno osušeni i izvagani filter papir, a volumen filtrata je izmjeren menzutom i korišten za analizu topljivog lignina i monosaharida. Zaostali talog ispiran je s vrućom vodom do neutralne pH-vrijednosti i potom korišten za analizu netopljivog lignina.

Udio lignina topljivog u kiselini u filtratu određen je spektrofotometrijski neposredno nakon hidrolize. Ostatak filtrata je zamrznut (u jednoj Falcon kiveti od 50 mL i 3 Falcon kivete od 15 mL), a nakon odmrzavanja je korišten za analizu glukoze, manoze s primjesama ksiloze i galaktoze, arabinoze i inhibitora (mravlje, octene i levulinske kiseline) HPLC metodom uz prethodnu odgovarajuću pripremu uzoraka. Iz dobivenih koncentracija glukoze, manoze s primjesama ksiloze i galaktoze i arabinoze izračunat je udio strukturnih ugljikohidrata glukana, manana s primjesama ksilana i galaktana i arabinana.

#### **3.3.2.5. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini**

Čvrsti dio uzorka zaostao nakon dvostupanjske hidrolize odvojen je od filtrata vakuum-filtracijom te je zajedno s filtrom prebačen u prethodno osušenu i odvagano Petrijevu zdjelicu. Nakon sušenja do konstantne mase pri 105 °C u odškrinutoj Petrijevoj zdjelici, i hlađenja u eksikatoru i vaganja izračunat je udjel lignina netopljivog u kiselini prema jednadžbi [2].

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

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

U filtratu kiselinskog hidrolizata određen je udjel lignina topljivog u kiselini (eng. acid soluble lignin, ASL) spektrofotometrijski pri valnoj duljini 205 nm, koristeći kvarcne kivete. Kao slijepa proba bio je korišten zrak. Pritom su razrjeđenja filtrata pripravljena tako da očitana apsorbanacija iznosi 0,7-1. Udjel lignina topljivog u kiselini izračunat je prema jednadžbi [3]:

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

gdje je:

A - apsorbanacija uzorka izmjerena pri 205 nm;

D - faktor razrjeđenja;

V - volumen filtrata [L]

$\alpha$  - koeficijent ekstrinkcije lignina [g/L·cm] (prema metodi TAPPI UM250 iznosi 110 g/L·cm)

b - širina kivete (iznosi 1 cm);

m - masa uzorka uzetog u analizu

### 3.3.2.7. Određivanje furana spektrofotometrijski

U tekućoj fazi dobivenoj kiselinskom predobradom u visokotlačnom reaktoru spektrofotometrijski je određena koncentracija furana, mjerenjem apsorbanacija pri 284 i 320 nm (prema metodi iz rada Martinez, 2000). Prethodno je izrađen baždarni pravac mjerenjem apsorbanacije otopina furana poznate koncentracije (Prilog 7.1.).

Uzorak koji sadrži nepoznatu koncentraciju furana razrijeđen je demineraliziranom vodom u omjeru 1:1000 te su izmjerene apsorbancije pri 284 i 320 nm i izračunata je njihova razlika. Koncentracija se odredi iz sljedeće jednadžbe baždarnog pravca [4]:

$$\gamma = \frac{\Delta A - 0.0173}{191.02} \quad [4]$$

gdje je

$\gamma$ (furani) – masena koncentracija furana [g/L]

$\Delta A = A_{284} - A_{320}$

### 3.3.2.8. Priprema uzoraka za analizu HPLC metodom

U uzrocima uzetim nakon kiselinske predobrade lignocelulozne sirovine i u kiselinskim hidrolizatima dobivenim dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom čvrstih uzoraka sirovine i čvrste faze zaostale nakon predobrade provedeno je taloženje proteina dodatkom 10% otopine cinkovog sulfata heptahidrata (10%w/v) u omjeru 1:1 (vol/vol). Uzorci su snažno izmiješani tijekom 20-tak sekundi (mikser EV-100, Tehnica, Železniki, Slovenija) i ostavljeni da odstoje 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Istaloženi proteini izdvojeni su centrifugiranjem (10000 g, 5 min; HC-240, Tehnica, Železniki, Slovenija), a supernatant je profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine 0,2 μm (Filteri za špricu najlon 0,22μm 25mm Spheros PK/50, LLG Labware). Pripremljeni uzorci su analizirani pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A/VP sustava (Poglavlje 3.3.2.9.)

### 3.3.2.9. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC)

HPLC metodom analizirani su uzorci tekuće faze dobivene nakon kiselinske predobrade lignocelulozne sirovine i filtrati dobiveni dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom čvrstih uzoraka (uzorci sirovine i čvrste faze dobivene kiselinskom predobradom).

Uzorci su pripremljeni na način opisan u poglavlju 3.3.2.8., a za analizu je korišten kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10A VP (Shimadzu, Kyoto, Japan). U uzorcima su određivane koncentracije ugljikohidrata (glukoze, ksiloze, arabinoze) i inhibitora (levulinska, octena i mravlja kiselina). Za pripremu svih otopina korištena je redestilirana voda čija je vodljivost iznosila manje od 1 $\mu$ S. Kao pokretna faza korištena je otopina H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 % v/v) u vodi. Po 20  $\mu$ L prethodno pripremljenog uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od 55 °C i brzini protoka pokretne faze od 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Podaci su analizirani pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10. Iz jednadžbi baždarnih pravca izračunate su koncentracije monosaharida i inhibitora u analiziranim uzorcima.

### 3.3.2.10. Izračunavanje udjela strukturnih ugljikohidrata

Masa polisaharida (glukan, manan s primjesama ksilana i galaktana, arabinan) u lignoceluloznoj sirovini i čvrstoj fazi nakon predobrade izračunata je iz mase odgovarajućih monosaharida (glukoze, ksiloze, arabinoze). U filtratu nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize izračunata je masa uz pomoć korekcijskog faktora ( $K_f$ ) prema jednadžbi [5]. Masa polisaharida sirovine koji su hidrolizirani tijekom predobrade izračunata je na isti način.

$$m_{ps} = c_{monosaharida} \cdot V_{hidrolizata} \cdot K_f \quad (9) \quad [5]$$

gdje je:

$m_{ps}$  – masa polisaharida (glukana, manana, arabinana)

$c_{monosaharida}$  – koncentracija monosaharida u hidrolizatu (tekućoj fazi) nakon obrade [g/L]

$V_{hidrolizata}$  – volumen [L] lignoceluloznog hidrolizata (tekuće faze nakon predobrade) odnosno filtrata nakon dvostupanjske hidrolize

$K_f$  – korekcijski faktor, tj. omjer molekulske mase monomerne građevne jedinice ugljikohidrata i monosaharida koji iznosi:

$K_f = 0,88$  za pentoze (ksiloza i arabinoza) (tj.  $132 \text{ g mol}^{-1}/150 \text{ g mol}^{-1}$ ),

$K_f = 0,9$  za heksoze (glukoza, galaktoza i manosa) (tj.  $162 \text{ g mol}^{-1}/180 \text{ g mol}^{-1}$ )

Udjel polimera u lignoceluloznoj sirovini i čvrstoj fazi nakon predobrade izračunava se prema jednadžbi **[6]**:

$$W_P = \frac{m_P}{w_{s.tv.} \cdot m_{s.tv.}} \quad [\text{g/g}] \quad \mathbf{[6]}$$

gdje je:

$w_P$  – maseni udjel ugljikohidrata (g polimera / g suhe tvari) [%]

$m_P$  – masa polimera u uzorku [g];

$w_{s.tv.}$  – maseni udio suhe tvari u uzorku;

$m_{s.tv.}$  – masa suhe tvari u uzorku [g] obrađene sirovine odnosno uzorka podvrgnutog kiselinskoj hidrolizi (oko 0,4 g)

### 3.3.2.11. Izračunavanje iskorištenja glukana i manana s primjesama ksilana i galaktana

Nakon predobrade sirovine izračunato je iskorištenje polimera (glukana, manana s primjesama ksilana i galaktana) za različite uvjete predobrade prema jednadžbi **[7]**:

$$\eta = \frac{m_{P/FK}}{m_{P/SIR}} \cdot 100 = \frac{m_{FK} \cdot w_{s.tv./FK} \cdot W_{P/s.tv./FK}}{m_{SIR} \cdot w_{s.tv./SIR} \cdot W_{P/s.tv./SIR}} \cdot 100 \quad [\%] \quad \mathbf{[7]}$$

gdje je:

$\eta$  – iskorištenje (%);

$m_{P/FK}$  – masa pojedinog polimera (glukan, odnosno manan) u krutoj fazi nakon obrade (g);

$m_{P/SIR}$  – masa istog polimera (glukan, odnosno manan) u sirovini (g);

$m_{FK}$  – masa krute faze (vlažnog filtarskog kolača) nakon obrade sirovine (g);

$w_{s.tv./FK}$  – maseni udio suhe tvari u krutoj fazi tj. filtarskom kolaču nakon obrade sirovine (FK);

$w_{P/s.tv./FK}$  – maseni udio polimera (glukan, manan s primjesama ksilana i galaktana) u suhoj tvari krute faze predobrađene sirovine tj. filtarskog kolača;

$m_{SIR}$  – masa lignocelulozne sirovine (g);

$w_{s.tv./SIR}$  – maseni udio suhe tvari u lignoceluloznoj sirovini

$w_{P/s.tv./SIR}$  – maseni udio polimera (glukan, manan s primjesama ksilana i galaktana) u suhoj tvari sirovine

Iskorištenje arabinana nije izračunato zbog njegovog malog udjela u korištenoj sirovini. Na sličan način izračunato je iskorištenje na ukupne polimere **[8]** i na ukupnu suhu tvar **[9]**.

$$\eta = \frac{m_{P/FK}}{m_{UP/SIR}} \cdot 100 = \frac{m_{FK} \cdot w_{s.tv./FK} \cdot w_{P/s.tv./FK}}{m_{SIR} \cdot w_{s.tv./SIR} \cdot w_{UP/s.tv./SIR}} \cdot 100 \quad [\%] \quad \mathbf{[8]}$$

gdje je:

$m_{UP/SIR}$  – masa ukupnih polimera u sirovini (g);

$w_{UP/s.tv./SIR}$  – maseni udio ukupnih polimera u suhoj tvari sirovine

$$\eta = \frac{m_{P/FK}}{m_{s.tv.}} \cdot 100 = \frac{m_{FK} \cdot w_{s.tv./FK} \cdot w_{P/s.tv./FK}}{m_{SIR} \cdot w_{s.tv./SIR}} \cdot 100 \quad [\%] \quad \mathbf{[9]}$$

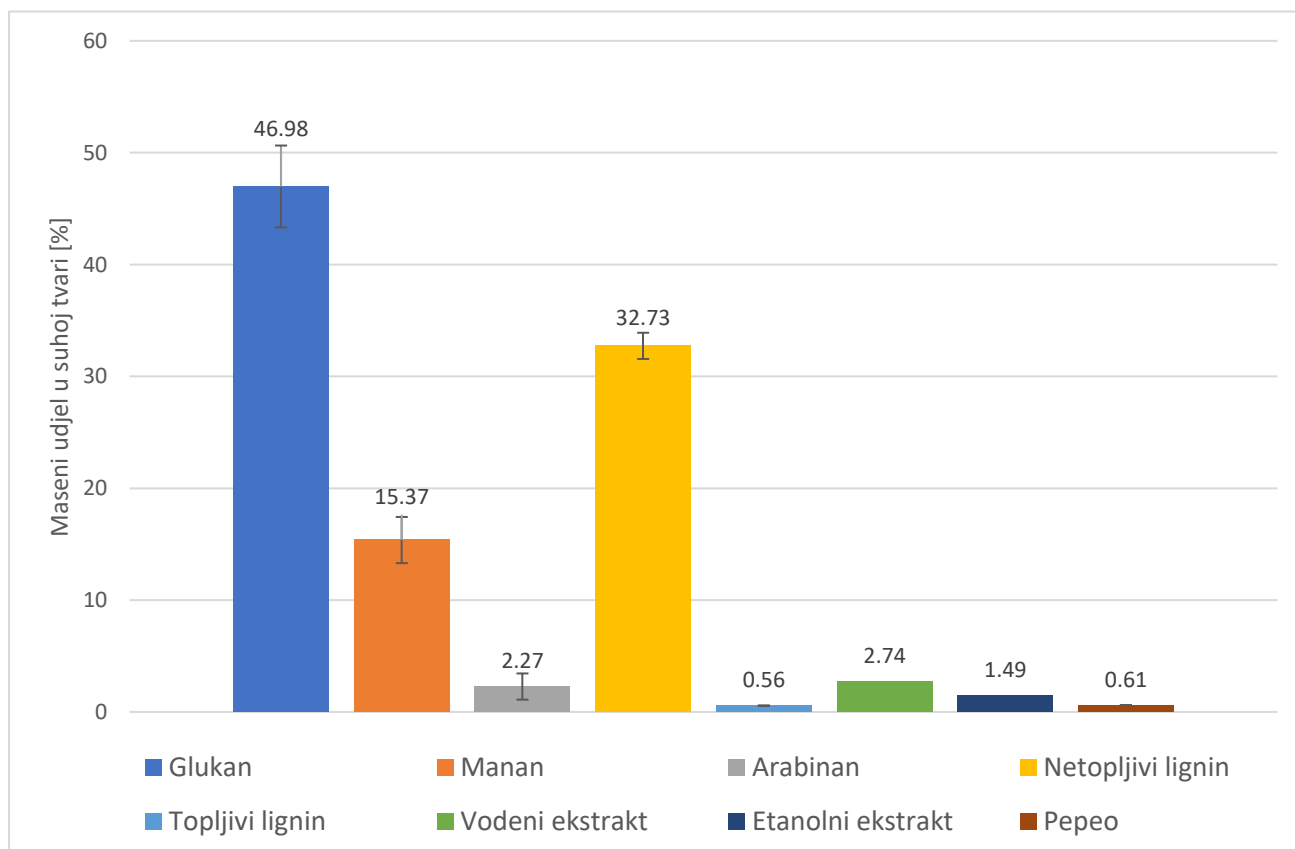


## 4. Rezultati i rasprava

Sirovina korištena u ovom eksperimentu bila je jelova piljevina (maseni udio suhe tvari 90.03%) čiji je sastav prikazan u Tablici 3. Provedena su preliminarna istraživanja za određivanje optimalnih uvjeta predobrade razrijeđenom sulfatnom kiselinom (0,5% w/v) u visokotlačnom reaktoru. Za ispitivanje utjecaja kiseline predobrade na lignoceluloznu sirovinu odabrana su vremena zadržavanja od 5, 10 i 15 minuta pri 180°C i 200°C te 5 i 10 minuta pri 210°C (Tablica 4). Nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru analizirane su dobivene tekuće i čvrste faze.

### 4.1. Kemijski sastav sirovine

Sastav sirovine je određen s ciljem usporedbe vrijednosti sirovine prije i poslije predobrade razrijeđenom kiselinom. Kemijski sastav jele ovisi o više faktora poput geografskog položaja i starosti drva. Stoga se vrijednosti dobivene u različitim istraživanjima mogu međusobno razlikovati. Jelova piljevina korištena u ovom radu sadržavala je 4.22% ukupnog ekstrakta u suhoj tvari (Slika 12). Prema Dashti i sur. (2012), drvo jele sadrži 65.33% holoceluloze, 6.58% ekstraktivnih tvari topljivih u acetonu, 5.23% vodenog ekstrakta i 32.88% lignina u suhoj tvari.

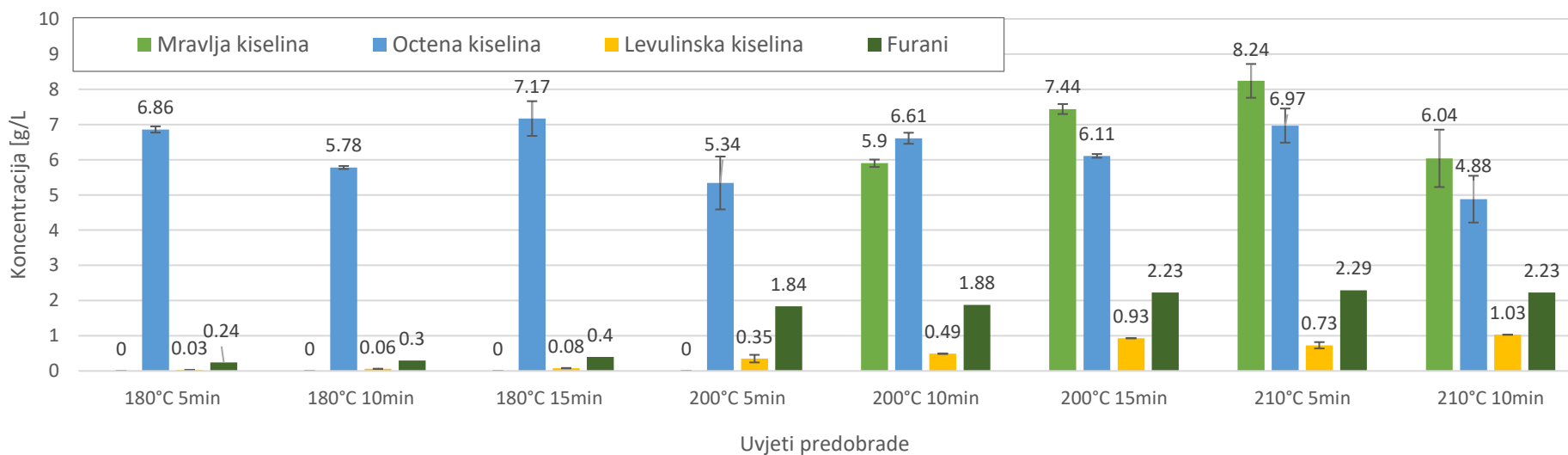
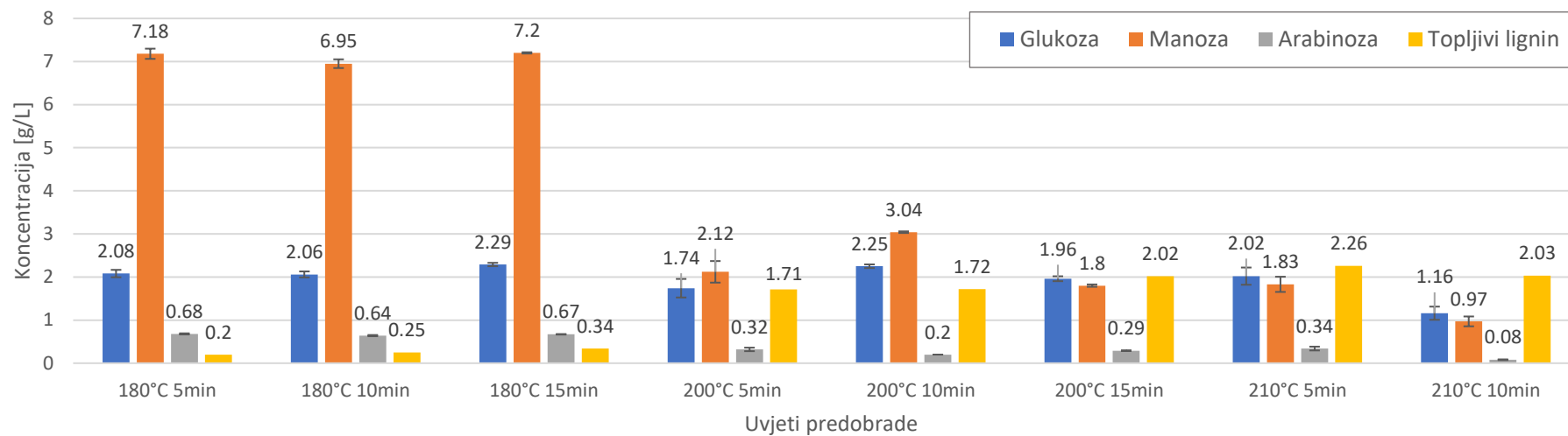


**Slika 12.** Prikaz sastava sirovine (jela sa  $90.03 \pm 0.128\%$  w/w suhe tvari).

Holocelulozu čine celuloza i hemiceluloza čiji zbroj u ovom slučaju (Slika 12) odgovara rezultatima navedenih autora. Udio lignina također odgovara literaturnim vrijednostima, a razlika udjela vodenog ekstrakta može se protumačiti kao varijabilnost u sastavu sirovine (Hanžek, 2015). Također, Dashti i sur. (2012) primjenili su drugu metodu ekstrakcije tj. bio je korišten aceton, a u ovom radu korišten je etanol. Vidljivo je iz literature (Da Silva Perez i sur., 2010) da u mekom drvu (Tablica 1) glukani čine oko 70% ukupnih polisaharida, manani 15-20%, ksilani 6-10%, galaktani 2-4% i arabinani manje od 2%. Arabinan u našim uzorcima jelove piljevine tvori 3.51% od ukupno određenih polisaharida što je dvostruko više nego u navedenoj literaturi. Manozna, ksiloza i galaktoza eluiraju se istovremeno iz kolone korištene pri HPLC analizi uzoraka jela. Stoga se u korištenom analitičkom sustavu ne mogu odrediti pojedinačne koncentracije ovih triju šećera. S obzirom da jela sadrži značajno više manana nego ksilana i galaktana, udio ovih polisaharida (oko 15% suhe tvari sirovine) izrazili smo kao koncentraciju manana s primjesama ksilana i galaktana (Da Silva Perez i sur., 2010). U nastavku istraživanja trebalo bi odabrati specifičnu kromatografsku kolonu za razdvajanje ugljikohidrata kako bi se odredio točniji sastav polisaharida. Udio glukana u ukupnim polisaharidima iznosi 73.38% (Slika 12) što u potpunosti odgovara vrijednostima koje je iznio Da Silva Perez i sur. (2010) (Tablica 1). Maseni udio ukupnog lignina u mekom drvetu općenito iznosi od 25 do 32.88% (Da Silva Perez i sur., 2010; Dashti i sur., 2012; Shafieri i sur., 2015), a rezultati analiza sirovine u ovom radu u potpunosti odgovaraju navedenim vrijednostima. Većinu ukupnog lignina (99%) u jelovoj piljevini činio je netopljivi lignin. Udio pepela bio je manji od 1% što je u skladu s literaturnim podacima (Philippoussis, 2009).

#### **4.2. Sastav tekućih hidrolizata dobivenih predobradom**

Visokotlačni reaktor primijenjen u ovim eksperimentima korišten je već ranije za predobradu lignoceluloznih sirovine kao što su pšenična slama (Ivančić, 2016; Mušak, 2016; Vidović, 2017; Galić, 2017; Grubišić, 2017; Marđetko i sur., 2018), kuruzovina (Lauder, 2016; Mušak, 2016) i kukuruzni oklasci (Mušak, 2016). Uvjeti predobrade jelove piljevine za eksperimente optimiranja kiseline predobrade razrijeđenom sumpornom kiselinom odabrani su u skladu s navedenim radovima. Sumporna kiselina katalizira degradaciju hemiceluloze iz preostale čvrste faze što neposredno omogućava pristup enzimima koji hidroliziraju celulozu (Jönsson i Martin, 2015). Sastav tekuće faze dobivene predobradom piljevine i pokazatelji uspješnosti ovog procesa prikazano su na Slici 12 i u Tablici 5.



**Slika 13.** Sastav tekuće faze dobivene predobradom jelove piljevine razrijeđenom sumpornom kiselinom (0.5 w/v) u visokotlačnom reaktoru.

**Tablica 5.** Pokazatelji uspješnosti procesa predobrade polisaharida koji su predobradom razgrađeni u monosaharide i prešli u tekuću fazu.

<b>Temperatura predobrade [°C]</b>	<b>180</b>			<b>200</b>			<b>210</b>	
<b>Vrijeme predobrade [min]</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>Iskorištenje glukana [%]</b>	5.28	5.35	5.71	4.00	5.24	4.61	4.35	2.72
<b>Iskorištenje manana [%]</b>	55.73	55.2	54.9	14.9	21.64	12.93	12.05	6.94
<b>Iskorištenje glukana na ukupne polisaharide [%]</b>	3.84	3.89	4.15	2.91	3.81	3.35	3.16	1.97
<b>Iskorištenje manana na ukupne polisaharide [%]</b>	13.26	13.13	13.06	3.54	5.15	3.08	2.87	1.65
<b>Iskorištenje glukana na suhu tvar [%]</b>	2.48	2.51	2.68	1.88	2.46	2.16	2.04	1.28
<b>Iskorištenje manana na suhu tvar [%]</b>	8.57	8.48	8.44	2.29	3.33	1.99	1.85	1.07

Ukupne koncentracije monosaharida u tekućoj fazi nakon predobrade kreću se u rasponu od 2.21 (uvjeti predobrade 210°C/10 minuta) do 10.16 g/L (180°C/15 minuta) (Slika 13). Ako usporedimo temperature obrade 180 i 200°C za vrijeme zadržavanja od 5 minuta, uočljivo je da pri 200°C značajno padaju koncentracije ukupnih šećera za skoro 60%. Taj pad je nakon 5 minuta najmanje uočljiv na glukozi (84 % od vrijednosti određene pri 180°C). Pri većim temperaturama dolazi i do degradacije celuloze. Uočeno je da se pri povećanoj temperaturi određeni udio monosaharida degradirao pri čemu su nastali inhibitori (mrvlja, octena i levulinska kiselina).

Koncentracije glukoze pri 180°C su približno jednake nakon 5 i 10 minuta zadržavanja, dok produženjem vremena tretmana na 15 minuta dolazi do povećanja koncentracije za otprilike 10%. Povećanje koncentracije glukoze izazvano je razgradnjom celuloze. U svim provedenim uvjetima koncentracije glukoze u tekućoj fazi kretale su se od 1.16 do 2.29 g/L. Istovremeno dolazi do oslobađanja glukoze razgradnjom celuloze i do daljnje degradacije oslobođene glukoze. Pri ekstremnijim uvjetima temperature i tlaka prilikom predobrade dolazi do jače razgradnje celuloze. Obzirom da je došlo do razgradnje celuloze u svim istraživanim uvjetima eksperimenta potrebno je provesti dalju optimizaciju uvjeta hidrolize pri nižoj temperaturi (160°C 5, 10 i 15 min).

Manoza (s primjesama ksiloze i galaktoze) je pri temperaturi od 180°C činila oko 70% ukupnih šećera. To je u skladu očekivanjima jer se kiselinskom predobradom većinom razgrađuje hemiceluloza. Ona je manje otporna na hidrolizu, u usporedbi s celulozom, zbog razgranate amorfne strukture (Harmsen i sur., 2013). Prilikom obrade pri 180°C uz različita vremena zadržavanja (5, 10 i 15 minuta) nije došlo do značajnih promjena koncentracije manoze u tekućoj fazi (oko 7 g/L) (Slika 13). Dio manoze se nakon oslobađanja raspada u hidroksimetilfurfural koji potom pri intenzivnim uvjetima predobrade može prijeći u levulinsku i mrvlje kiselinu. Pri 200°C koncentracija manoze pala je na otprilike 25-44% od vrijednosti postignutih pri 180°C, a istodobno je vidljiv porast koncentracije furana (5.6-7.7 puta) te levulinske kiseline (8.2-11.6 puta) u odnosu na isto vrijeme zadržavanja.

Pokazatelji uspješnosti procesa (Tablica 5) izračunati su po jednadžbama opisanim u Poglavlju 3.3.2.11. Pri 180°C iskorištenje manana za sva tri vremena zadržavanja iznosi preko 50% izraženo na početni manan, preko 13% na ukupne polisaharide te ispod 10% izraženo na suhu tvar početne sirovine. Iskorištenja izračunata za gluklan iznose 5-6% na početni gluklan, oko 4% na ukupne polisaharide, odnosno ispod 3% na ukupnu suhu tvar.

Za arabinozu nisu izračunata ova iskorištena budući da su se koncentracije arabinoze u hidrolizatima kretale između 0.08 i 0.68 g/L, što iznosi iznosile su od 3.62 do 8.11% od koncentracija ukupnih šećera u tekućim hidrolizatima. Stoga prisutnost arabinoze možemo smatrati zanemarivom u usporedbi s drugim šećerima. Pri razmatranju optimalnih uvjeta hidrolize, što se tiče koncentracije šećera, fokusirali smo se na glukozu i manozu koji su najzastupljeniji monosaharidi u polisaharidima jele (Da Silva Perez i sur., 2010).

Alifatske kiseline nastaju razgradnjom polisaharida i njihovih razgradnih produkata tijekom kiselinske hidrolize lignoceluloznih materijala. Octena kiselina nastaje deaciliranjem hemiceluloze (Shahbazi i Zhang, 2010). Levulinska kiselina je produkt razgradnje hidroksimetilfurfurala, a mravlja kiselina nastaje razgradnjom i furfurala i hidroksimetilfurfurala. Najveće inhibicijsko djelovanje ima mravlja kiselina, a slijede ju levulinska te potom octena kiselina (Mussatto i Roberto, 2003).

Mravlja kiselina nije detektirana u tekućim kiselinskim hidrolizatima pri 180°C niti 200°C nakon 5 minuta obrade. Pri temperaturi 200°C došlo je do nastajanja mravlje kiseline s povećanjem vremena zadržavanja na 10 i 15 minuta. Koncentracije mravlje kiseline u tekućim hidrolizatima pri 200 i 210 iznosile su 5.9-8.2 g/L. Najveća koncentracija mravlje kiseline uočena u hidrolizatima iznosi oko 80% od inhibicijske koncentracije koju navodi van der Pol (2014). Nakon obrade pri 210°C tijekom 10 minuta bilo je prisutno manje mravlje kiseline nego nakon 5 minuta obrade pri istoj temperaturi. Obzirom da vrelište mravlje kiseline iznosi 100.7°C pri tlaku 1,01 bar (Zeitsch, 2000), može se pretpostaviti da je moguće njezino isparavanje iz visokotlačnog reaktora. Obzirom na oštre uvjete obrade, navedenom padu koncentracije također je mogla doprinijeti razgradnja mravlje kiseline na plinove CO<sub>2</sub>, CO i vodik (Nelson i Engelder, 1926).

Levulinska kiselina, koja nastaje razgradnjom furfurala i hidroksimetilfurfurala (Mussatto i Roberto, 2003), bila je prisutna u svim analiziranim uzorcima tekuće faze nakon predobrade jelove piljevine. Koncentracije levulinske kiseline rastle su proporcionalno temperaturi i vremenu zadržavanja, a isti trend su pokazale i koncentracije furana. Može se zaključiti da je istovremeno došlo do nastajanja furana (uglavnom furfurala i hidroksimetilfurfurala) koji su se dalje razgrađivali na levulinsku kiselinu (Palmqvist i sur., 2000). Prisutne koncentracije octene kiseline (od 5.34 do 7.17 g/L) također su značajno manje od inhibicijskih vrijednosti zabilježenih za octenu kiselinu kao pojedinačni inhibitor (van der Pol, 2014). Do pada koncentracije octene kiseline, vjerojatno je došlo zbog njezinog jačeg isparavanja budući da temperatura ključanja iznosi 118.1°C (Campbell i Gieskes, 2011).

Također, do gubitka kiseline iz reaktora može doći zbog otvaranja sigurnosnog ventila. Koncentracije furana u dobivenim tekućim kiselinskim hidrolizatima iznosile su od 0.24 do 2.29 g/L i rastle su proporcionalno temperaturi i vremenu obrade. Navedene koncentracije značajno su manje od koncentracija furfurala i hidroksimetilfurfurala koje van der Pol (2014) navodi kao inhibirajuće za rast radnih mikroorganizama.

Važno je napomenuti da navedene vrijednosti iz rada van der Pol (2014) uzimaju u obzir samo inhibicijsko djelovanje pojedinačnih inhibitora. Mješavina inhibitora pri manjoj koncentraciji može imati jači inhibicijski učinak od većih koncentracija pojedinačnih inhibitora. To je stoga što različiti inhibitori koji su prisutni mogu djelovati sinergistički (Alriksson, 2006).

#### **4.3. Sastav čvrste faze dobivene kiselinskom predobradom**

Hidrolizom čvrstog ostatka kiselinske predobrade osim glukoze nisu detektirani drugi monosaharidi. Može se zaključiti da u čvrstoj fazi obrađene sirovine osim glukana nije bilo drugih polisaharida ili su bili prisutni u vrlo malim količinama (Tablica 6). Moguće je i da je tijekom dvostupanjske hidrolize (Poglavlje 3.3.2.4.) došlo do degradacije oslobođenih monosaharida iz uzorka. Udjeli glukana u suhoj tvari čvrstih ostataka predobrade iznosili su između 45.44 i 58.78% i bili su najmanji pri 210°C. Preračunavanjem glukoze u glukane dobiveni su udjeli od 48.83 do 51.36% pri 180°C, pri 200°C od 45.95 do 58.78% i pri 210°C od 45.44 do 48.84%. Ne može se uočiti pravilnost u sastavu čvrste faze nakon kiselinske obrade što se djelomično može pripisati nehomogenosti sastava sirovine.

Inhibitori su prisutni u svim uzorcima čvrste faze nakon predobrade, ali se ne može uočiti jasna ovisnost između njihovih masenih udjela i uvjeta predobrade. Pri 210°C i s vremenom zadržavanja od 10 minuta primijećeni su najmanji udjeli octene, mravlje i levulinske kiseline.

**Tablica 6.** Sastav čvrste faze dobivene predobradom jele razrijeđenom sumpornom kiselinom (0.5 w/v) u visokotlačnom reaktoru.

<b>Temperatura predobrade [°C]</b>	<b>180</b>			<b>200</b>			<b>210</b>	
<b>Vrijeme predobrade [min]</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
<b>w (glukana) [%w/w s.tv.]</b>	48.83	46.09	51.36	45.95	54.42	58.78	48.84	45.44
<b>w (mravlje kiseline) [%w/w s.tv.]</b>	3.08	3.68	7.04	4.37	3.37	4.59	3.71	0.68
<b>w (octene kiseline) [%w/w s.tv.]</b>	6.98	8.32	7.31	6.41	7.09	8.35	6.96	4.20
<b>w (levulinske kiseline) [%w/w s.tv.]</b>	0.38	0.46	0.35	1.28	0.47	0.42	0.27	0.0
<b>w (topljivog lignina) [%w/w s.tv.]</b>	0.39	0.34	0.31	0.36	0.31	0.42	0.43	0.42
<b>w (netopljivog lignina) [%w/w s.tv.]</b>	36.8	42.9	38.3	49.7	42.3	40.8	40.6	43.7



U odnosu na sirovinu koja je sadržavala oko 33% ukupnog lignina (Slika 12), u čvrstim ostacima predobrade došlo je do povećanja masenog udjela lignina od 12 do 50% (Tablica 6). Do toga je došlo zbog razgradnje polisaharida iz sirovine. Tijekom provedenih eksperimenata obrade nije uočen pravilan obrazac promjene udjela lignina, a za to može postojati više objašnjenja. Zbog specifične strukture lignina pretpostavljamo da se lignin nejednako razgrađuje s različitih strana molekule (Kuhad i sur., 1997). Također, pri ekstremnim uvjetima kiselinske obrade moguće je nastajanje pseudolignina. Pseudolignin je polifenolni materijal, nalik na lignin, koji sadrži alifatske, aromatske i karbonilne strukture nastale iz fragmenata celuloze ili hemiceluloze oslobođenih tijekom kiselinske hidrolize. Nastajanje pseudolignina dovodi do povećanja udjela netopljivog lignina u suhoj tvari (Xianzhi i sur., 2017; Aarum i sur., 2018).

Budući da je primarni cilj predobrade bilo dobivanje kiselinskog hidrolizata za submerzni uzgoj mikroorganizama, trebalo bi istražiti tretmane u blažim uvjetima, pri manjoj temperaturi (160°C) uz ista vremena zadržavanja (5, 10 i 15 min). Pretpostavlja se će pri manjim temperaturama predobrade odnos oslobođenih monosaharida i inhibirajućih spojeva biti pogodniji za uzgoj mikroorganizama, odnosno, da se u tekućoj fazi može dobiti veća koncentracija monosaharida i manja koncentracija inhibitora. Također, dobiva se čvrsta faza kao sekundarni proizvod koji se u naknadnim istraživanjima može koristiti za enzimsku hidrolizu pomoću celulaza. Na temelju vizualne procjene izgleda tekućih hidrolizata uočeno je da su bili puno svjetliji nego u slučaju ranije istraživanih lignoceluloznih sirovine obrađenih u istim uvjetima (Ivančić, 2016; Lauder, 2016; Mušak, 2016; Vidović, 2017; Galić, 2017; Grubišić, 2017; Marđetko i sur., 2018). Na temelju toga može se zaključiti da vizualna procjena izgleda hidrolizata tekuće faze i čvrste faze nakon obrade nije prikladan kriterij za brzu procjenu uspješnosti predobrade.

## 5. Zaključci

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu doneseni su slijedeći zaključci:

1. Kao sirovina u ovom radu korištena je jelova piljevina s 90.03% suhe tvari koja se sastojala od 46.98% glukana, 15.37% manana, 2.27% arabinana, 32.73% netopljivog lignina, 0.56% topljivog lignina, 4.22% ukupnog ekstrakta te 0.61% pepela u suhoj tvari.
2. Predobrada lignocelulozne sirovine razrijeđenom sumpornom kiselinom (0.5% w/v) u visokotlačnom reaktoru provedena je pri temperaturama od 180°C, 200°C i 210°C uz vremena zadržavanja od 5, 10 i 15 minuta, a nakon predobrade odvojene su tekuća i čvrsta faza. Najbolji rezultati su dobiveni provođenjem kiselinske hidrolize jelove piljevine pri 180°C uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta. Kiselinski hidrolizat dobiven u tim uvjetima sadržavao je 9.94 g/L ukupnih šećera, koje su sačinjavale glukoza (2.08g/L), manosa s primjesama ksiloze i galaktoze (7.17g/L), arabinoza (0.68g/L) i topljivi lignin (0.20g/L). Prisutni inhibitori bili su octena kiselina (6.86g/L), levulinska kiselina (0.03g/L) i furani (0.24g/L) dok mravlja kiselina nije detektirana.
3. Na temelju ujednačenih koncentracija glukoze (2.06-2.29g/L) u tekućim hidrolizatima dobivenim pri 180°C za različita vremena zadržavanja (5, 10 i 15 minuta) vidljivo je da u tim uvjetima dolazi do oslobađanja glukoze iz celuloze. Kako bi se smanjila razgradnja celuloze i postigla uglavnom razgradnja hemiceluloze potrebno je provesti ovakve eksperimente u blažim uvjetima, tj. pri nižoj temperaturi uz kraća vremena zadržavanja (160°C, 5, 10 i 15 minuta).
4. Nakon provedbe procesa u različitim uvjetima, u suhoj tvari čvrste faze prevladavali su glukani (45.44 - 58.78%w/w) dok drugi polisaharidi nisu bili detektirani. Ostatak uzorka činio je uglavnom netopljivi lignin (36.8 - 49.7%w/w). Od inhibitora bili su prisutni octena (4.20 - 8.35%w/w), mravlja (0.68 - 7.03%w/w) i levulinska kiselina (maksimalno 1.28%w/w).
5. S obzirom da se iz korištene kromatografske kolone manosa, ksiloza i galaktoza eluiraju pri istom retencijskom vremenu, nije bilo moguće odrediti pojedinačne koncentracije navedenih monosaharida, stoga su one u ovom radu izražene kao koncentracije manoze s primjesama ksiloze i galaktoze. U nastavku istraživanja trebalo bi primjeniti odgovarajuću kromatografsku kolonu koja može razdvojiti navedene monosaharide, s ciljem određivanja pojedinačnih koncentracija.

## 6. Literatura

Aarum I., Devle H., Ekeberg D., Horn S.J., Stenstrøm Y., (2018) Characterization of pseudo-lignin from steam exploded birch. *ACS Omega*. 3(5):4924-4931.

Acharya S., Chaudhary A. (2012) Bioprospecting thermophiles for cellulase production: A review. *Brazilian journal of microbiology*. **43**, 844-856.

Adler, E. (1977) Lignin chemistry-past, present and future. *Wood Science Technology*. **11**, 169-218.

Agbor V.B., Cicek N., Sparling R., Berlin A., Levin D.B. (2011) Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*. **29**, 675–685.

Alriksson, B. (2006) Ethanol from lignocellulose: Alkali detoxification of dilute-acid spruce hydrolysates. Dissertation for the degree of Doctor of Science in Technology, Karlstad, University Studies.

Avgerinos G.C., Wang D. (1983) Selective delignification for fermentation of enhancement. *Biotechnology Bioengineering*. **25**, 67–83

Azadi P., Inderwildi O., Farnood R., King D. (2013) Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: a critical review. *Renew Sustain Energy Rev* **21**, 506–523.

Bajpai P. (2016) Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production. *Briefs in green chemistry for sustainability*, Springer.

Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S., Saddler, J. (2006) Inhibition of cellulase, xylanase and beta-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal Biotechnology*. **125**, 198-209.

Brodeur G., Yau E., Badal K. Collier, Ramachandran J.B., Ramakrishnan K., (2011) Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A Review. *Enzyme research*. 787532.

Campbell A., Gieskes J. (2011) The isobaric boiling points of the system: acetic acid – chloroform – water at a pressure of 760 mm Hg. *Canadian Journal of Chemistry*. **42**, 186-189.

Chandel, A.K., da Silva, S.S., Singh, O.V., (2011) Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. *Biofuel production—recent developments and prospects*. str. 226-246.

Da Silva Perez D., Guillemain A., Berthelot A., N'guyen N., De Morogues F., Gomes C. (2010) Evaluation of forestry biomass quality for the production of second-generation biofuels. Institut Technologique FCBA, Domaine Universitaire, BP 251, 38044 - Grenoble, France.

Dashti H., Shahverdi M., (2012) Effect of pre-steaming on mass transfer properties of fir wood (*Abies Alba* L.); a gymnosperm species with torus margo pit membrane. *Bioresources*. **7**, 1907-1918.

Galić, M. (2017) Proizvodnja bioetanola na blago kiselinskom hidrolizatu pšenične slame dobivenom pomoću fosforne kiseline u različitim mjerilima (Diplomski rad). Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Gandini A., Belgacem N. (2013) The state of the art of polymers from renewable resources.

Grubišić, M. (2017) Proizvodnja bioetanola na blago kiselinskim hidrolizatima pšenične slame dobivenim pomoću sumporne kiseline u različitim mjerilima (Diplomski rad). Prehrambeno- biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Hadar, Y. (2013) Sources for lignocellulosic raw materials for the production of ethanol. *Lignocellulose Conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production*. Springer, Njemačka, str. 21 - 38.

Hanžek M., (2015) Utjecaj alkalne obrade kukuruznih oklasaka na udjele lignina i celuloze (Završni rad). Prehrambeno- biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

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

Hsu T.C., Guo G.L., Che, W.H., Hwang W.S. (2010) Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*.

Ivančić, F. (2016). Predobrada pšenične slame za proizvodnju bioetanola (Završni rad). Prehrambeno- biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Jönsson L.J., Alriksson B., Nilvebrant N.O. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology Biofuels*. **6**(1), 16.

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

Karimi K. (2015) Lignocellulose-Based Bioproducts. 1st ed. Switzerland: Springer International Publishing, 1-37, 85-155.

Kuhad R., Singh A., Eriksson K. (1997) Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fibre cell walls. *Biotechnology In The Pulp And Paper Industry*, 45-125.

Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M., Stroeve P. (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **48** (8), 3713-3729.

Kumar S., Prasad S., Kharia S. (2017) Furfural and 5-HMF: Potent fermentation inhibitors and their removal techniques. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. **6**, 2060-2066.

Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Kerstin S., Zacchi G., Nilvebrant N.O. (1999) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*. **24**, 151-159.

Lauder, A. (2016) Predobrada kukuruzovine za proizvodnju bioetanola (Završni rad). Prehrambeno- biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Lenihan P.O., O'Neill A., Ahmad M., Rooney D., Walker G. (2010) Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*. **156**, 395-403.

Lešić, T. (2014) Analiza ekstraktivnih tvari i ligina u bukovoju piljevini, pšeničnoj slami i kukuruznim oklascima (Završni rad). Prehrambeno- biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Majewicz, T. and Podlas, T. (2000) Cellulose ethers. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.

- Mardetko, N., Novak, M., Trontel, A., Grubišić, M., Galić, M. i Šantek, B. (2018) Bioethanol production from dilute-acid pre-treated wheat straw liquor hydrolysate by genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, **32** (4), 483-499.
- Martinez A., Rodriguez M.E., York S.W., Preston J.F., Ingram L.O., (2000) Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass, *Biotechnology Progress*. **16** (4), 637-641.
- Mosier N., Wyman C., Dale B, Elander R., Lee Y., Holtzapple M., Ladisch M R. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **96**, 673-686.
- Mušak, L. (2016) Proizvodnja etanola na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (Diplomski rad). Prehrambeno- biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Nguyen Q., Tucker M., Keller F., Beaty D., Connors K., Eddy F. (1999) Dilute acid hydrolysis of softwoods. *Applied Biochemical Biotechnology*. **77**, 133-142.
- Novak, M., Trontel, A., Pavlečić, M., Mušak, L., Govedarica, D., Lauder, A., Šantek, B. (2017) Anaerobni uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. **12** (1-2), 60-70.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal B., (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. **74**(1), 25-33.
- Palonen H. (2004) Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. 951-38-6271-2. 520.
- Peng F., Ren JL., Xu F., Sun R.C. (2011) Chemicals from hemicelluloses: a review. *Sustainable production of fuels, chemicals, and fibers from forest*. American Chemical Society, Washington, DC. str. 219–259.
- Petravić-Tominac, V., Tolvajčić, M., Stanzer, D., Mrvčić, J., Hanousek Čiča, K. i Šantek, B. (2018) Potencijal bakterija za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. *Glasnik Zaštite Bilja*, **41** (4), 74-82.
- Petterson R. (1984) The Chemical Composition of Wood. *Advances in Chemistry*, 57-126.

- Philippoussis A. N. (2009) Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. U: *Biotechnology for agro-industrial residues*. (Singh-Nee Nigam, P.; Pandey, A., ured.), 164-187.
- Roberto I., Mussatto S., Rodrigues R. (2003) Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Industrial Crops and Products*. **17**, 171-176.
- Sánchez C., (2008) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*. **27**, 185-94.
- Shafiei M., Kumar R., Karimi K. (2015) Pretreatment of lignocellulosic biomass, lignocellulose-based bioproducts. 1st ed. Switzerland: Springer International Publishing, 85-155.
- Shahbazi G., Zhang B. (2010) Dilute and concentrated acid hydrolysis of lignocellulosic biomass.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker D., (2012) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Co.
- Sun Y., Cheng J., (2002) hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A Review. *Bioresource technology*. **83**, 1-11.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, **9**, 1621-1651.
- Tolvajčić, M. (2016) Mikroorganizmi za fermentaciju lignoceluloznih hidrolizata (Završni rad). Prehrambeno- biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Trajano L. H., Wyman C. (2013) Fundamentals of biomass pretreatment at low pH.
- Udawatte C., Sotheeswaran S. (2015) Immobilization of selected microbes at some selected solid supports for enhanced fermentation process. *Fermentation Technology* 04.
- van der Pol E., Bakker R., Baets P., Eggink G. (2014) By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels. *Applied microbiology and biotechnology*. 98.

Vidal, P.F., Molinier J., (1988) Ozonolysis of lignin – Improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass*. **16**, 1-17.

Vidović, P. (2017) Proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatu pšenične slame dobivenom alkalnom predobradom u visokotlačnom reaktoru (Diplomski rad). Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Volynets B., Ein-Mozaffari F., Dahman Y. (2016) Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. *Green Processing and Synthesis* **6**(1), 1-22.

W. L. Nelson i C. J. Engelder (1926) The thermal decomposition of formic acid. *The Journal of Physical Chemistry* 30 (4), 470-475.

Xianzhi M., Ragauskas A., (2017) Pseudo-lignin formation during dilute acid pretreatment for cellulosic ethanol. *Recent Adv Petrochem Sci*. **1**(1), 555551.

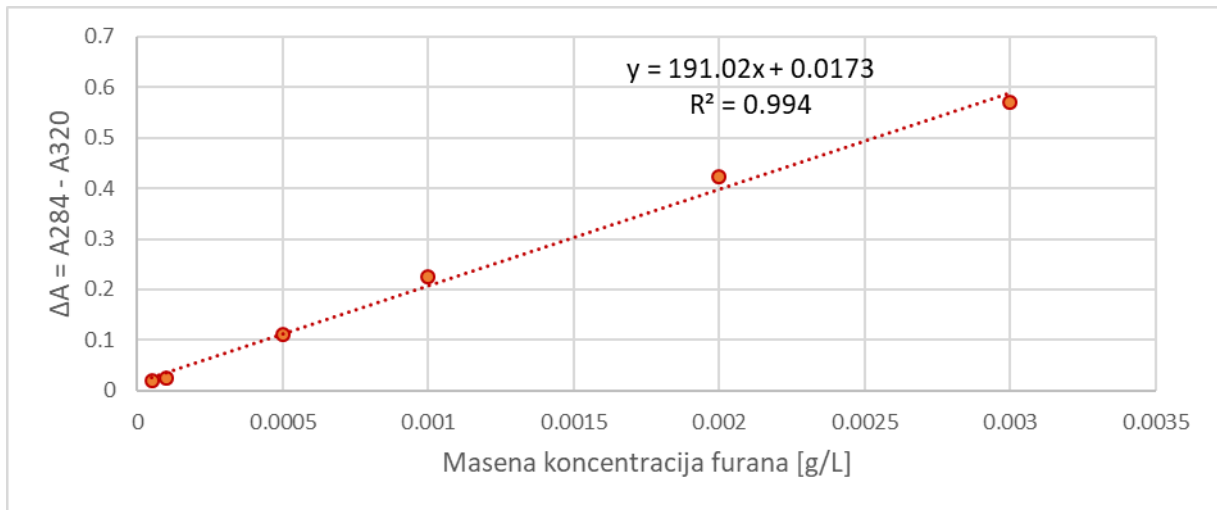
Yang B., Wyman, C. (2004) Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and bioengineering*. **86**, 88-95.

Zeitsch K. (2000) Properties of formic acid, *Sugar Series*, p.247.



## 7. Prilozi

### Prilog 1. Baždarni dijagram i jednadžba za izračun koncentracije furana



**Prilog 2.** Volumen tekuće faze te masa i udio suhe tvari u vlažnom čvrstom ostatku dobivenom predobradom jele razrijeđenom sumpornom kiselinom (0.5 w/v) u visokotlačnom reaktoru.

Temperatura predobrade [°C]	180			200			210	
	5	10	15	5	10	15	5	10
Volumen tekuće faze [L]	5.97	6.10	5.86	5.40	5.47	5.52	5.06	5.50
m (vlažnog čvrstog ostatka) [g]	2156.90	2119.60	2189.43	2104.70	2183.30	2152.50	2113.10	1891.60
w (suhe tvari vlažnog čvrstog ostatka) [%w/w]	12.50	14.80	13.67	13.72	13.54	12.02	11.75	14.24
m (suhe tvari u ukupnom mokrom kolaču) [g]	269.70	313.60	299.20	288.68	295.66	258.77	248.34	269.44

**Prilog 3.** Čvrsta faza nakon predobrade pri manjim temperaturama.



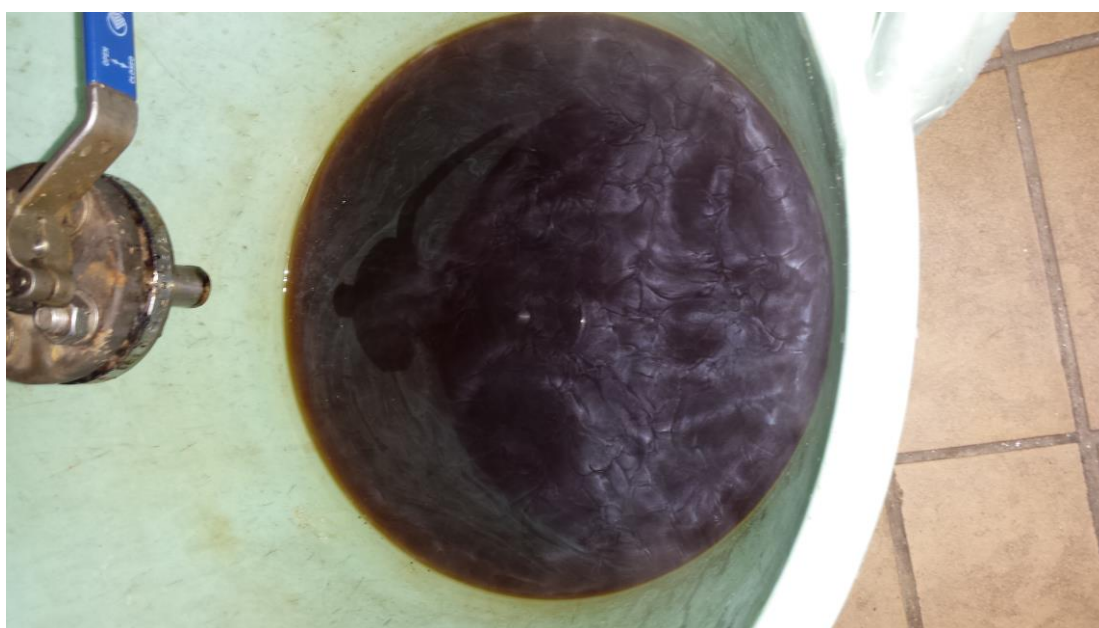
**Prilog 4.** Tekuća faza nakon predobrade pri manjim temperaturama.



**Prilog 5.** Čvrsta faza nakon predobrade pri većim temperaturama.



**Prilog 6.** Tekuća faza nakon predobrade pri većim temperaturama.





**Prilog 7.** Izgled taloga nakon predobrade pri manjim temperaturama.



**Prilog 8.** Izgled taloga nakon predobrade pri većim temperaturama.



## Izjava o izvornosti

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



---

Ime i prezime studenta