

# Simultana saharifikacija i fermentacija predtretiranih kukuruznih oklasaka pomoću plijesni *Mucor indicus*

---

Jedrejčić, Petra

Master's thesis / Diplomski 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:159:271684>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Petra Jedrejčić

1159/BPI

**SIMULTANA SAHARIFIKACIJA I  
FERMENTACIJA  
PREDTRETIRANIH  
KUKURUZNIH OKLASAKA  
POMOĆU PLIJESNI *Mucor indicus***

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Maria Novaka te uz pomoć asistenta Nenada Marđetka, mag. ing. bioproc.

Diplomski rad je izrađen u okviru HRZZ-IP-2018-01-9717 projekta "*Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina*".

Ovom prilikom zahvalila bih svom mentoru, doc. dr. sc. Mariu Novaku na savjetima, strpljenju i pomoći pri izradi ovog rada, kao i asistentu Nenadu Marđetku, mag. ing. bioproc. na vodstvu, razumijevanju i trudu uloženom za izradu ovog rada. Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Antoniji Trontel, Marini Grubišić, mag. ing. bioproc. i gospodinu tehničaru Igoru Livadi za pomoć pri provođenju eksperimenata i dobroj atmosferi tijekom trajanja izrade ovog diplomskog rada.

Posebno se želim zahvaliti svojoj obitelji, Dinu i svim prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom mog obrazovanja.

## 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

### SIMULTANA SAHARIFIKACIJA I FERMENTACIJA PREDTRETIRANIH KUKURUZNIH OKLASAKA POMOĆU PLIJESNI *Mucor indicus*

*Petra Jedrejčić, 1159/BPI*

**Sažetak:** U ovom radu proveden je proces simultane enzimске saharifikacije i fermentacije ispranog i usitnjenog čvrstog dijela zaostalog nakon kiselinske predobrade kukuruznih oklasaka. U cilju uspješne provedbe procesa istražen je utjecaj dva različita enzimska pripravka (Cellulase Blend-a i Viscozyme-a) u koncentraciji od 10 % (vol/vol) te njihove kombinacije, 2 % (vol/vol) Cellulase Blend i 5 % (vol/vol) Viscozyme na iskorištenje hidrolize glukana, ksilana i ukupnih ugljikohidrata korištene sirovine. Najviši stupanj hidrolize glukana (100 %) i ukupnih ugljikohidrata (89,90 %) dobiven je uz 10 % (vol/vol) Cellulase Blend na 40 °C u hranjivoj podlozi, a ksilana (93,51 %) uz 10 % (vol/vol) Viscozyme pri 40 °C u puferu. Kako bi se ispitao utjecaj temperature i podloge na uspješnost procesa proizvodnje bioetanol pomoću plijesni *M. indicus* proveden je aerobni uzgoj u Erlenmayer tikvicama tehnikom simultane enzimске saharifikacije i fermentacije na 30 i 40 °C u puferu i podlozi. Najveća uspješnost procesa proizvodnje etanol zabilježena je kod uzgoja u podlozi uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a pri 30 °C, a produktivnost je iznosila 0,0939 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. U istim uvjetima te uz dodatak istog enzimskog pripravka koncentracije 4 % (vol/vol) proveden je uzgoj *M. indicus* u bioreaktoru s miješalom, a produktivnost je nakon 22 h uzgoja iznosila 0,1432 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Nakon uzgoja provedena je izolacija glukozamina.

**Ključne riječi:** kukuruzni oklasci, enzimska hidroliza, *Mucor indicus*, simultana saharifikacija i fermentacija, bioetanol

**Rad sadrži:** 66 stranica, 26 slika, 7 tablica, 71 literaturnih navoda, 2 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc. dr. sc. Mario Novak

**Pomoć pri izradi:** Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Doc. dr. sc. Antonija Trontel
2. Doc. dr. sc. Mario Novak
3. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. Prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjena)

**Datum obrane:** 19. rujna 2019.

## 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

### SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION OF PRETREATED CORN COBS BY FUNGUS *Mucor indicus*

*Petra Jedrejčić, 1159/BPI*

**Abstract:** In this paper, the procedure of simultaneous saccharification and fermentation of washed and shredded solid residues after dilute acid pretreatment of corn cobs was performed. In order to successfully carry out the process, the effect of two different enzyme blends (Cellulase Blend and Viscozyme at a concentrations of 10 % (vol/vol)) and their combination, 2 % (vol/vol) Cellulase Blend and 5 % (vol/vol) Viscozyme) on the efficiency of hydrolysis of glucan, xylan and total carbohydrates of the raw material used was investigated. The highest degree of hydrolysis of glucan (100 %) and total carbohydrates (89.90 %) was obtained with a 10 % (vol/vol) Cellulase Blend at 40 °C in the matrix which simulates the broth, and xylan (93.51 %) with 10 % (vol/vol) Viscozyme at 40 °C in acetate buffer. In order to examine the influence of temperature and media on the success of the bioethanol production process by *M. indicus*, aerobic cultivation was performed in Erlenmayer flasks by the technique of simultaneous enzymatic saccharification and fermentation at 30 and 40 °C in two different broths. The highest bioprocess productivity of 0.0939 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> was observed in broth with the addition of 4 % (vol/vol) Cellulase Blend at 30 °C. *M. indicus* was grown in a stirred tank bioreactor under the same conditions and with the addition of the same enzyme blend at a concentration of 4 % (vol/vol). After 22 hours of cultivation the productivity reached value of 0.1432 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. The isolation of glucosamine was performed after cultivation.

**Keywords:** corn cobs, enzymatic hydrolysis, *Mucor indicus*, simultaneous saccharification and fermentation, bioethanol

**Thesis contains:** 66 pages, 26 figures, 7 tables, 71 references, 2 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 Mario Novak, Assistant professor

**Technical support and assistance:** Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.

#### Reviewers:

1. PhD Antonija Trontel, Assistant professor
2. PhD Mario Novak, Assistant professor
3. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
4. PhD Jasna Novak, Full professor (substitute)

**Paper defended:** 19 September 2019

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. Lignocelulozne sirovine.....	3
2.1.1. Sastav lignoceluloznih sirovina .....	3
2.1.1.1. Celuloza.....	4
2.1.1.2. Hemiceluloza .....	5
2.1.1.3. Lignin .....	5
2.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina .....	6
2.2.1. Fizikalne metode predobrade .....	7
2.2.2. Kemijske metode predobrade.....	7
2.2.3. Fizikalno-kemijske metode predobrade.....	8
2.2.4. Biološke metode predobrade.....	9
2.2.5. Enzimaska hidroliza .....	9
2.3. Radni mikroorganizmi u procesima proizvodnje biogoriva i biokemikalija.....	10
2.3.1. Kvasci .....	10
2.3.2. Bakterije .....	11
2.3.3. Plijesni.....	11
2.3.3.1. <i>Mucor indicus</i> .....	11
2.4. Tehnike vođenja procesa proizvodnje bioetanol iz lignoceluloznih sirovina.....	16
2.4.1. Odvojena hidroliza i fermentacija (SHF).....	16
2.4.2. Simultana hidroliza i ko-fermentacija (SScF) .....	16
2.4.3. Integrirani bioproceni sustav (CBP).....	16
2.4.4. Simultana hidroliza i fermentacija .....	17
2.5. Biogoriva .....	18
2.5.1. Biogoriva prve generacije .....	18
2.5.2. Biogoriva druge generacije .....	18
2.5.3. Biogoriva treće generacije.....	19
2.6. Bioetanol.....	19
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	22
3.1. Materijali.....	22
3.1.1. Sirovina .....	22
3.1.2. Radni mikroorganizam.....	22
3.1.3. Kemikalije .....	23
3.1.4. Enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka.....	24
3.1.4.1. Priprema acetatnog pufera .....	24



3.1.4.2.	Priprema podloge .....	24
3.1.4.3.	Enzimi korišteni za enzimsku hidrolizu predobrađenih kukuruznih oklasaka.....	24
3.1.5.	Enzimi korišteni za proces proizvodnje etanola uz <i>Mucor indicus</i> tehnikom simultane saharifikacije i fermentacije.....	25
3.1.6.	Hranjive podloge za održavanje i uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> .....	25
3.1.6.1.	Hranjiva podloga za održavanje čiste kulture .....	25
3.1.6.2.	Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma.....	25
3.1.6.3.	Hranjiva podloga za uzgoj u Erlenmayer tikvicama i u bioreктору s miješalom tehnikom simultane enzimске saharifikacije i fermentacije .....	25
3.2.	Uređaji i oprema .....	26
3.2.4.	Uređaj za visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju (HPLC).....	26
3.2.5.	Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC).....	26
3.2.6.	Bioreaktor s miješalom .....	26
3.2.7.	Ostali uređaji .....	27
3.3.	Metode .....	28
3.3.4.	Određivanje sastava početne sirovine dvostrukom kiselinskom hidrolizom.....	28
3.3.5.	Određivanje udjela netopivog lignina .....	28
3.3.6.	Određivanje topivog lignina .....	28
3.3.7.	Ukupni furani.....	29
3.3.8.	Enzimska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka .....	29
3.3.9.	Uzgoj čiste kulture plijesni.....	29
3.3.10.	Uzgoj inokuluma .....	29
3.3.11.	Uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> u tikvicama na predobrađenim kukuruznim oklascima ..	30
3.3.12.	Uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> u bioreктору s miješalom.....	30
3.3.13.	Izolacija glukozamina .....	30
3.3.13.1.	Uklanjanje proteina iz biomase.....	30
3.3.13.2.	Uklanjanje fosfata iz materijala netopivog u lužini (AIM).....	30
3.3.13.3.	Izolacija glukozamin hidroklorida .....	31
3.3.14.	Analiza uzoraka visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) .....	31
3.3.15.	Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti (UPLC) .....	31
3.4.	Određivanje parametara uspješnosti tijekom uzgoja plijesni <i>Mucor indicus</i> .....	32
3.4.2.	Prinos produkta ( $Y_p$ ) .....	32
3.4.3.	Produktivnost (Pr) .....	32
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>33</b>
4.1.	Određivanje sastava početne sirovine dvostrukom kiselinskom hidrolizom .....	34
4.2.	Enzimska hidroliza predobrađene sirovine .....	35

4.3. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> i proizvodnja bioetanola na predobrađenim kukuruznim oklascima u Erlenmayer tikvicama .....	46
4.3.1. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> u acetatnom puferu i podlozi na temperaturi od 30 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend.....	46
4.3.1.1. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> u podlozi na 30 °C bez dodatka enzima .....	47
4.3.1.2. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> u podlozi pri 30 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a .....	48
4.3.1.3. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> u acetatnom puferu na 30 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a .....	50
4.3.2. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> u acetatnom puferu i podlozi na temperaturi od 40 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend.....	51
4.3.2.1. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> u podlozi na 40 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a .....	52
4.3.2.1. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> u acetatnom puferu na 40 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a .....	53
4.4. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> u bioreaktoru s miješalom .....	56
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>58</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>59</b>
<b>7. PRILOZI .....</b>	<b>66</b>
4.5. Baždarni pravci za određivanje koncentracije supstrata i proizvoda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).....	66
4.6. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije supstrata i proizvoda tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti .....	66

UVOD

## 1. UVOD

Potaknuti ekonomski rast uz zaustavljanje degradacije okoliša i dalje je jedan od glavnih globalnih izazova za čovječanstvo. Trenutno neodrživa upotreba zemljinog ograničenog prirodnog kapitala dovela je do širokog spektra negativnih utjecaja na okoliš uključujući globalno zatopljenje, promjenu kvalitete ekosustava te sve veće gubitke u bioraznolikosti (Correa i sur., 2019). Svjetska industrija i gospodarstvo su ovisni o fosilnim gorivima kao primarnim izvorima energije, a njihovo izgaranje doprinosi povećanju emisije stakleničkih plinova te posljedično i prethodno navedenim problemima pa se kao alternativa potiče korištenje obnovljivih izvora energije odnosno biogoriva.

Biogoriva su tekuća ili plinska goriva za potrebe prijevoza proizvedena iz biomase (NN 141/2005). Tekuća biogoriva dijele se prema vrsti sirovine iz koje se proizvode. U biogoriva prve generacije ubrajaju se goriva proizvedena iz škrobnih i šećernih sirovina, biljnih ulja i masti životinjskog podrijetla. Najpoznatije gorivo prve generacije, bioetanol, najčešće se proizvodi iz šećerne trske ili repe i kukuruza (Ivančić Šantek i sur., 2016). Međutim, proizvodnja biogoriva prve generacije konkurira proizvodnji i utječe na cijenu hrane (Janda i sur., 2012). Druga generacija biogoriva proizvodi se iz lignocelulozne biomase kao što su poljoprivredni i industrijski otpadci. U usporedbi sa šećernim i škrobnim sirovinama, lignocelulozna biomasa je jeftinija i dostupnija te ne utječe na proizvodnju i cijenu hrane (Rezić, 2012). Biogoriva treće generacije proizvode se iz biomase algi (Behera i sur., 2015).

Otpadne lignocelulozne sirovine imaju veliki potencijal te predstavljaju jedan od najvažnijih budućih izvora energije. Uporabom lignocelulozne biomase kao sirovine za proizvodnju biogoriva dolazi do smanjene emisije CO<sub>2</sub>, odnosno takva je proizvodnja CO<sub>2</sub> neutralna (Velmurugan i Incharoensakdi, 2018). Međutim, glavni izazov ovoj proizvodnji predstavlja neophodna predobrada takvih sirovina. Fizikalnim, kemijskim, fizikalno-kemijskim i biološkim postupcima predobrade razgrađuje se kompleksna struktura lignoceluloznih materijala do jednostavnijih jedinica kako bi se postigla efikasna enzimaska hidroliza i uspješna fermentacija (Rezić, 2012).

Tijekom fermentacije lignoceluloznog hidrolizata mikroorganizmi previru pentoze i heksoze u etanol. U proizvodnji etanola se najčešće upotrebljava kvasac *Saccharomyces*

*cerevisiae* koji raste na heksozama, ali ne i na pentozama (Ivančić Šantek i sur., 2016). Međutim, najzastupljeniji šećer u većini lignoceluloznih hidrolizata je ksiloza (Milatti i sur., 2005), te se s ciljem povećanja iskoristivosti procesa sve češće koriste mikroorganizmi koji mogu metabolizirati ksilozu do etanola, posebice zigomicete kao što je *Mucor indicus* (Karimi i Zamani, 2013). Osim visokih prinosa etanola, koji se mogu usporediti s prinosima procesa u kojima se kao radni mikroorganizam koristi *S. cerevisiae*, *Mucor indicus* u simultano vođenom procesu saharifikacije i fermentacije daje i visoke prinose hitozana, prirodnog polimera sa širokom upotrebom u biotehnologiji, medicini te prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Safaei i sur., 2015).

Cilj ovog rada bio je provesti aerobni uzgoj plijesni *Mucor indicus* na čvrstoj fazi zaostaloj nakon kiselinske predobrade kukuruznih oklasaka uz proizvodnju etanola i hitozana. Prije samog procesa proveden je aerobni uzgoj u tikvicama na različitim temperaturama (20, 30, 40 °C) te se odredila temperatura na kojoj se dobivaju najbolji prinosi etanola. Proces simultane saharifikacije i fermentacije je vođen aerobno u bioreaktoru s miješalom. Nakon procesa provedena je izolacija glukozamina iz dobivenog hitozana.

TEORIJSKI DIO

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Lignocelulozne sirovine

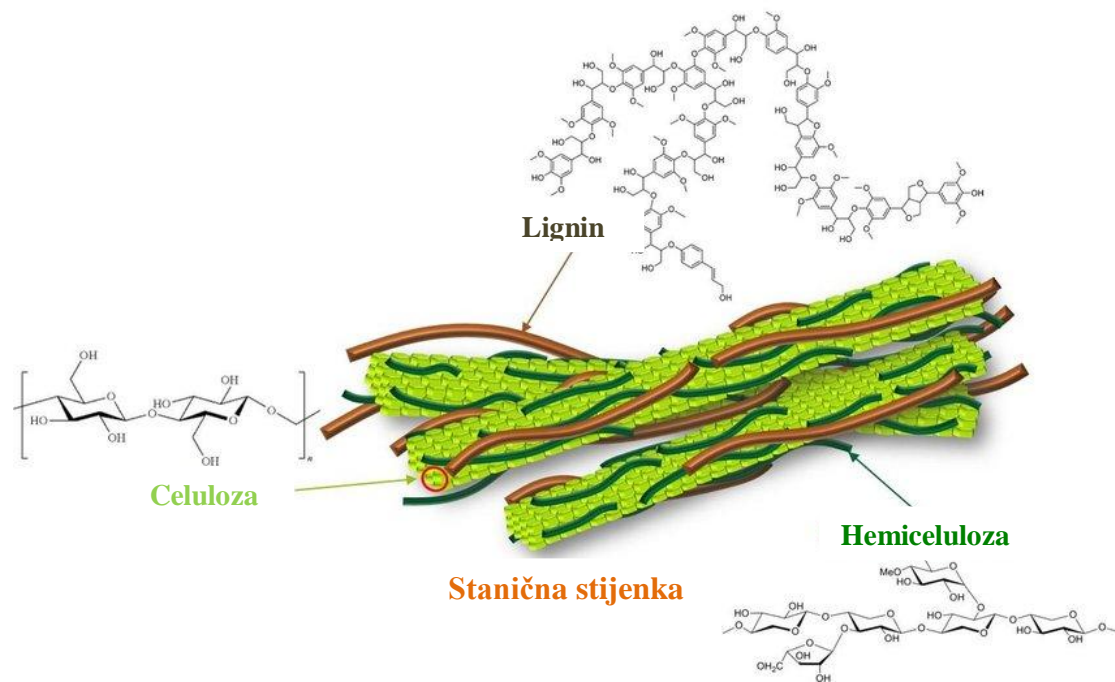
Lignocelulozni materijali predstavljaju sirovine za proizvodnju biogoriva druge generacije. Lignocelulozna biomasa je s obzirom na izvor sirovine grupirana u nekoliko kategorija: šumski ostaci (piljevina, otpadni papir, trava), poljoprivredni i industrijski ostaci (slama, kukuruzni oklasci, kukuruzovina, nejestivo sjemenje, pulpa šećerne repe), kućanski otpad (lignocelulozni i komunalni otpad), ostaci prehrambene industrije i ostali kruti otpad. S niskom cijenom od 60 američkih dolara po toni suhe tvari, lignoceluloza ima veliki potencijal kao sirovina za proizvodnju bioetanola (Wyman i sur., 2019).

#### 2.1.1. Sastav lignoceluloznih sirovina

Lignocelulozna biomasa (Slika 1.) sastavljena je od celuloze (38 – 50 %), hemiceluloze (23 – 32 %) i lignina (15 – 25 %) uz mali udio ostalih komponenata poput pektina, proteina i minerala (McKendry, 2002). Sastav nekih lignoceluloznih sirovina prikazan je u Tablici 1. Celuloza i hemiceluloza su linearni polisaharidi dok je lignin heterogeni, unakrsno povezani, trodimenzionalni polimer koji obavija celulozu i hemicelulozu (Mussatto i sur., 2008).

**Tablica 1.** Sastav nekih lignoceluloznih sirovina (Sun i Cheng, 2002)

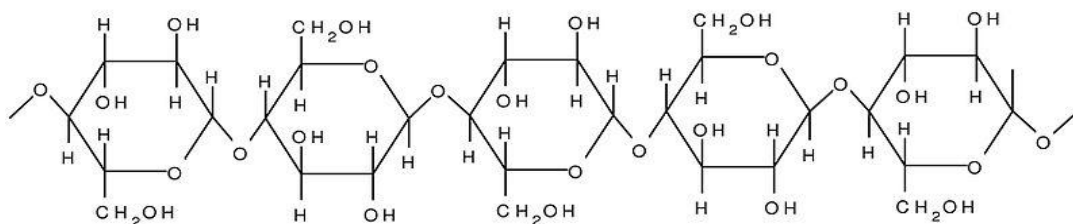
<b>Lignocelulozne sirovine</b>	<b>Celuloza (%)</b>	<b>Hemiceluloza (%)</b>	<b>Lignin (%)</b>
<b>Kukuruzni oklasci</b>	45	35	15
<b>Trava</b>	25 - 40	35 - 50	10 - 30
<b>Papir</b>	85 - 99	0	0 - 15
<b>Pšenična slama</b>	30	50	15
<b>Lišće</b>	15 - 20	80 - 85	0



**Slika 1.** Struktura lignoceluloznog materijala (Jensen i sur., 2017)

#### 2.1.1.1. Celuloza

Celuloza (Slika 2.) je kvantitativno najzastupljeniji ugljikohidrat u prirodi koji se nalazi u biljkama. Kemijski gledano, celuloza je linearni homopolimer glukoze u kojem su molekule glukoze povezane  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama, s prosječnom molekulskom masom od 100 000 Da. Linearna struktura omogućuje kompaktno povezivanje glukoznih lanaca van der Waalsovima i vodikovim vezama, čime se formira kristalična, netopiva struktura mikrofibrila koji sadrži 36 takvih lanaca (Guerriero i sur., 2015). Mikrofibrili su međusobno povezani vodikovim vezama te s vanjske strane obavijeni hemicelulozom (Wyman i sur., 2019).

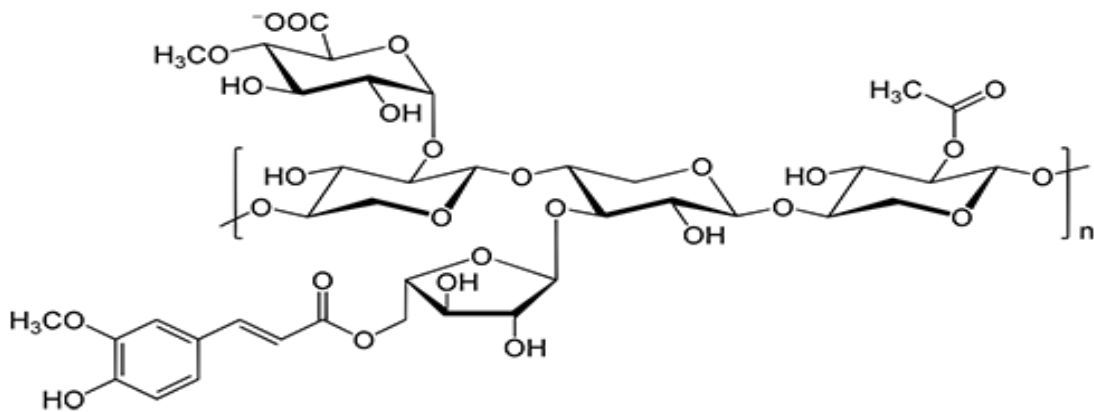


**Slika 2.** Molekulska struktura celuloze (Anonymus 1, 2019)



### 2.1.1.2. Hemiceluloza

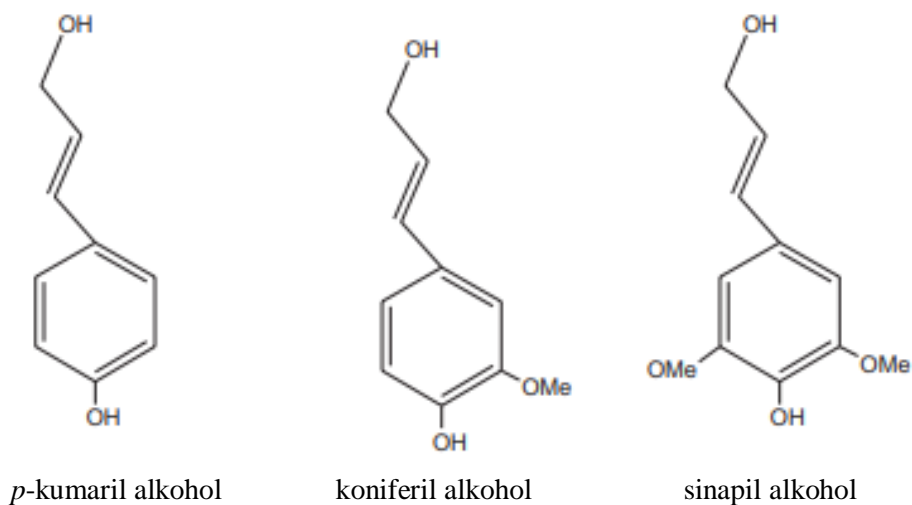
Hemiceluloza je heteropolimer stupnja polimerizacije manjeg od 200 jedinica. Osnovni sastav čine pentoze (ksiloza i arabinoza), heksoze (glukoza, galaktoza, manosa) i glukuronska kiselina (Sun i sur., 2016). Šećeri su međusobno povezani  $\beta$ -1,4-, a mjestimice i  $\beta$ -1,3-glikozidnim vezama. Sastav i struktura hemiceluloze ovise o vrsti sirovine, pa su tako tvrda drva građena od ksilana i glukomanana, a meka od glukomanana, ksilana, arabinogalaktana, ksiloglukana i glukana. Na Slici 3. prikazana je struktura ksilana. Hemicelulozna vlakna obavijaju celulozna vlakna te se povezuju s pektinom i ligninom formirajući heterogenu unakrsnu mrežu heksoza i pentozu u staničnim stijenkama biljaka (Sharma i sur., 2019). Razgranatost hemiceluloze čini njezinu strukturu amorfnom, zbog čega se ona lakše hidrolizira kiselinom nego celuloza (Wyman i sur., 2019).



Slika 3. Struktura ksilana (Anonymus 2, 2009)

### 2.1.1.3. Lignin

Lignin je aromatski, amorfni heteropolimer sintetiziran iz fenilpropanoidnih prekursora koji je netopiv u vodi. Struktura se kao i kod hemiceluloze razlikuje ovisno o sirovini iz koje je dobiven (Wyman i sur., 2019). Tipični monomeri iz kojih je građen lignin su *p*-kumaril, koniferil i sinapil alkoholi prikazani na Slici 4., a pripadaju skupini monolignol monomera (Guerriero i sur., 2015).



**Slika 4.** Monomeri lignina (Velmurugan i Incharoensakdi, 2018)

Heterogen kemijski sastav i različite kemijske veze (eterske, esterske i kovalentne veze) čine ga teško razgradivom sirovinom (Velmurugan i Incharoensakdi, 2018). Lignin prisutan u lignoceluloznoj biomasi obavija celulozna vlakna i onemogućava enzimsku hidrolizu celuloze sprječavajući fizički kontakt celulaza i celuloznih vlakana što dovodi i do smanjenog prinosa fermentabilnih šećera dobivenih razgradnjom celuloze te zbog toga predstavlja jedan od glavnih problema u proizvodnji bioetanolu iz lignoceluloznih sirovina (Weng i sur., 2008).

## 2.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina

Zbog kompleksnog sastava lignoceluloznih sirovina najveći izazov u proizvodnji bioproizvoda koristeći lignocelulozu kao supstrat je proces predobrade biomase. Kristaličnost i stupanj polimerizacije celuloze, njezina dostupna površina i „zaštita“ koju joj daju lignin i hemiceluloza te stupanj acetilacije hemiceluloze su glavni razlozi koji utječu na kompleksnost i nizak stupanj uspješnosti enzimske hidrolize (Taherzadeh i Karimi, 2008). Predobrada sirovina potrebna je kako bi se promijenio sastav i struktura sirovina te kako bi se postigla efikasna enzimska hidroliza i brza fermentacija bez inhibicije enzima i/ili radnog mikroorganizma (Rezić, 2012).

Metode predobrade lignoceluloznih sirovina mogu se podijeliti na fizikalne, fizikalno-kemijske, kemijske i biološke predtretmane, a u proizvodnji se za predtretmane koriste kombinacije navedenih metoda (Taherzadeh i Karimi, 2008).

### **2.2.1. Fizikalne metode predobrade**

Fizikalni procesi predobrade uključuju mljevenje, zračenje, tretman  $\gamma$ -zrakama, ekstruziju, ekspanziju i pirolizu. Navedene metode mogu povećati dostupnu površinu celuloze te smanjiti njezinu kristaličnost i stupanj polimerizacije čime se omogućava efikasnija enzimska hidroliza (Maurya i sur., 2015). Međutim, jedan od glavnih nedostataka fizikalnih predtretmana je njihova neekonomičnost, odnosno visoki zahtjevi za energijom za procese mljevenja i tretmana  $\gamma$ -zrakama pa se stoga u industriji koriste u kombinaciji s ostalim predtretmanima (Galbe i Zacchi, 2007).

### **2.2.2. Kemijske metode predobrade**

Kemijske metode predobrade koje se najčešće koriste su kiselinska i alkalna predobrada sirovina. Zajedničke karakteristike svih kemijskih metoda su visoka efikasnost zbog čega dolazi do djelomične ili potpune delignifikacije te se smanjuje kristaličnost i stupanj polimerizacije celuloze.

#### *1. Kiselinska predobrada*

Tretiranje lignoceluloznog materijala kiselinama pri visokim temperaturama uvelike utječe na kasniju enzimsku hidrolizu budući da tijekom procesa dolazi do razgradnje lignina, hemiceluloze i celuloze (Sun i Cheng, 2002). Najčešće korištena kiselina je sumporna kiselina ( $H_2SO_4$ ) nakon koje slijede klorovodična (HCl), fosforna ( $H_3PO_4$ ) i dušična ( $HNO_3$ ) kiselina (Taherzadeh i Karimi, 2008). Kiselinski predtretmani se provode ili pri visokoj temperaturi (140 – 200 °C) uz dodatak razrijeđenih kiselina (uobičajeno ispod 4 %) (Galbe i Zacchi, 2007) ili pri niskoj temperaturi (oko 40 °C) uz koncentrirane kiseline (30 – 70 %) (Taherzadeh i Karimi, 2008). Ovisno o uvjetima provođenja i sastavu sirovine, predobrada može potrajati nekoliko minuta do nekoliko sati (Sarkar i sur., 2012).

#### *2. Alkalna predobrada*

Alkalnom predobradom lignoceluloznih sirovina dolazi do razgradnje estera i glikozidnih lanaca čime se povećava porozitet lignoceluloze odnosno dolazi do djelomičnog uklanjanja lignina i hemiceluloze te do smanjenja kristaličnosti celuloze.

Najčešće korištene kemikalije su natrijeva (NaOH), kalijeve (KOH), kalcijeve ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) ili amonijeva lužina ( $\text{NH}_4(\text{OH})_2$ ) (Sarkar i sur., 2012). Kod tretmana koji se provode na visokim temperaturama uz kraće reakcijsko vrijeme koristi se natrijev, a kod tretmana na nižim temperaturama uz duže reakcijsko vrijeme koristi se kalcijev hidroksid.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  je u usporedbi s NaOH jeftiniji te ekološki prihvatljiviji, budući da se može reciklirati reakcijom s  $\text{CO}_2$  (Sun i sur., 2016).

Sve kemikalije koje se koriste u alkalnim i kiselinskim predtretmanima mogu se koristiti u razrijeđenom ili koncentriranom obliku te se ovisno o tome reakcije provode na nižim ili višim temperaturama uz duže ili kraće vrijeme zadržavanja što utječe na cijenu samog procesa. Također, za primjenu kemijskih metoda predobrade potrebno je koristiti nekorozivnu opremu, a budući da nastaju toksični proizvodi nužno je provesti njihovu detoksifikaciju (Sharma i sur., 2019). Osim toga, prije enzimske hidrolize potrebno je iz supstrata isprati zaostale kiseline i lužine (Galbe i Zacchi, 2007).

### **2.2.3. Fizikalno-kemijske metode predobrade**

Tip predobrade koji uključuje fizikalne i kemijske metode naziva se fizikalno-kemijska predobrada. Najčešće korištene metode su tretman parom, eksplozija vlakana amonijakom (AFEX), predobrada toplom vodom i eksplozija  $\text{CO}_2$  (Taherzadeh i Karimi, 2008).

#### *1. Tretman parom*

Tretman parom je jedan od najčešće korištenih predtretmana lignoceluloznih sirovina. Kod ove metode lignocelulozna biomasa se tretira parom pod visokim tlakom (20 – 50 bar, 160 – 290 °C) nekoliko minuta nakon čega se naglo smanjuje tlak na atmosferski prilikom čega dolazi do dekompresije sustava (Sarkar i sur., 2012). Tijekom procesa dolazi do hidrolize hemiceluloze do oligomernih šećera, pri čemu se organske kiseline iz lignoceluloznih sirovina ponašaju kao katalizatori i ubrzavaju sam proces hidrolize. Efikasnost procesa može se povećati uz  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ili  $\text{SO}_2$  kao katalizatore (Galbe i Zacchi, 2007).

#### *2. Predobrada toplom vodom*

Predobrada toplom vodom podrazumijeva kuhanje lignocelulozne biomase u vodi pri visokim temperaturama i tlakovima. Metoda je slična tretmanu parom, ali se provodi pri

nižim temperaturama čime se u vodenoj fazi dobivaju više koncentracije polisaharida i oligosaharida (Galbe i Zacchi, 2007). Glavna prednost ove metode u usporedbi s drugima je ta da nisu potrebne kemikalije te metoda ne zahtijeva upotrebu posebnih nekorozivnih reaktora (Taherzadeh i Karimi, 2008).

#### **2.2.4. Biološke metode predobrade**

U biološkim predtretmanima koriste se različiti mikroorganizmi (bakterije i gljive) koji sintetiziraju enzime potrebne za razgradnju lignocelulozne sirovine i čine ju prikladnijom za naknadnu razgradnju enzimima. Korišteni mikroorganizmi razgrađuju lignin i hemicelulozu dok celuloza uglavnom ostaje nerazgrađena (Taherzadeh i Karimi, 2008). Osim što su ekološki najprihvatljiviji, biološki tretmani imaju i druge prednosti poput niskog utroška energije i kemikalija. Međutim, rast i metabolizam radnih mikroorganizama treba pažljivo kontrolirati, što otežava provođenje procesa koji je vrlo spor i za koji je potreban veliki prostor za uzgoj (Sarkar i sur., 2012).

#### **2.2.5. Enzimska hidroliza**

Enzimska hidroliza predobrađene sirovine podrazumijeva proces enzimske razgradnje polisaharida do monomernih šećera koje radni mikroorganizam može fermentirati do etanola i drugih proizvoda. Najčešće korišteni enzimi su celulolitički i hemicelulolitički enzimi. Za kompletnu razgradnju celuloze potrebno je sinergističko djelovanje četiri celulolitičkih enzima: endoglukanaza, celobiohidrolaza, egzoglukohidrolaza i  $\beta$ -glukozidaza. Endoglukanaze nasumično cijepaju glikozidne veze u amorfnoj strukturi celuloze čime nastaju polimerizirani oligosaharidi. Celobiohidrolaze razgrađuju celulozu tako da iz molekule uklanjaju celobiozu. Egzoglukohidrolaze uklanjaju jedinice glukoze s nereducirajućih krajeva ciklodekstrina, a  $\beta$ -glukozidaze hidroliziraju celobiozu do glukoze te razgrađuju niskomolekulske ciklodekstrine (Maitan-Alfenas i sur., 2015). Razgradnju hemiceluloze do ksiloze, arabinoze i manoze provode ksilanaze (Kumar i sur., 2009). Hidroliza se odvija u blagim uvjetima pri pH 4,5 – 5,0 i temperaturi 40 – 50 °C (Ivančić Šantek i sur., 2016). Primjenom takvih uvjeta sprječava se proizvodnja toksičnih nusproizvoda (Meinita i sur., 2019).

Glavni proizvođači celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima su filamentozne gljive i plijesni. U procesu enzimske hidrolize lignoceluloze najčešće se koriste lignin degradirajuće gljive bijelog i smeđeg truljenja (Galbe i Zacchi, 2007) poput *Ceriporiopsis subvermispota* i *Irpex lacteus* (Sindhu i sur., 2016). Osim hidrolitičkih enzima (celulaze, hemicelulaze,

pektinaze) ove gljive proizvode i oksidativne enzime. Oksidativni enzimi poznati su kao enzimi koji aktivno djeluju na ugljikohidrate (CAZymes) i klasificirani su u različite grupe enzima poput glikozid hidrolaza, glikozid transferaza i polisaharid liaza, a njihova je glavna funkcija depolimerizacija lignina (Alvarez i sur., 2016).

Uspješnost enzimske hidrolize lignoceluloznih sirovina ne ovisi samo o efikasnosti enzima, već i o fizikalnim, kemijskim i morfološkim karakteristikama materijala. Stoga su istraživanja u cilju poboljšanja produktivnosti enzimske hidrolize podijeljena u dva smjera – enzimski i supstratni. Što se tiče enzima, fokus je na povećanju enzimske aktivnosti i termalne stabilnosti te smanjenju inhibicije krajnjim produktima (Sun i sur., 2016). S druge strane, građa i strukturna svojstva biomase značajno utječu na efikasnost samih enzima. Osim rezidualnog lignina nakon predobrade, utjecaj na enzime imaju i oslobođeni šećeri. Celobioza i glukoza dobivene tijekom hidrolize mogu djelovati inhibirajuće na celulolitičke enzime, a koncentracija supstrata, dodanog enzima ili surfaktanta može utjecati na konačne prinose šećera te na kinetiku korištenih enzima (Niglio i sur., 2019).

### **2.3. Radni mikroorganizmi u procesima proizvodnje biogoriva i biokemikalija**

Postoji ograničen broj mikroorganizama koji fermentiraju ugljikohidrate, uglavnom heksoze i pentoze, u etanol. Da bi se mogao efektivno koristiti u proizvodnji etanola, mikroorganizam mora zadovoljavati određene kriterije odnosno mora davati visoke prinose etanola, proizvoditi ga s visokom produktivnosti te imati visoku toleranciju na njegovu prisutnost. Nadalje, poželjno je da mikroorganizam ima mogućnost fermentacije nekoliko šećera istovremeno te da je tolerantan na inhibitore uobičajeno prisutne u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina. Kako bi se smanjio rizik od kontaminacije, radni mikroorganizam bi trebao podnositi visoke temperature i niske pH vrijednosti podloge (Binod i sur., 2013). U nastavku su opisani neki od najčešće korištenih mikroorganizama u proizvodnji bioetanola.

#### **2.3.1. Kvasci**

U industrijskoj proizvodnji etanola najčešće korišteni mikroorganizmi su kvasci, posebice *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasci imaju nekoliko specifičnih karakteristika koje ih čine jedinstvenima, a to su brzi rast, visoki prinosi etanola i tolerancija na okolišni stres kao što su visoke koncentracije etanola i niske koncentracije kisika. Iako nema mogućnost

asimilacije pentozama, *S. cerevisiae* je industrijski najznačajniji kvasac. Osim njega, u proizvodnji se još koriste *Schizosaccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp. i *Pichia* sp. *Pichia stipitis* spada u kvasce koji mogu rasti na pentozama te se može koristiti u industrijskim procesima proizvodnje bioetanola (Binod i sur., 2013).

### **2.3.2. Bakterije**

Najčešće korištene bakterije u proizvodnji etanola su *Clostridium acetobutylicum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Sarcina ventriculi* i *Zymomonas mobilis* (Binod i sur., 2013). U procesu proizvodnje etanola s pomoću imobiliziranih stanica bakterija *Zymomonas mobilis* postižu se viši prinosi etanola u odnosu na procese provedene s prethodno navedenim bakterijama. Međutim, nedostatak ove bakterije je taj da proizvodi velike količine nusproizvoda poput octene i glicerola (Rezić, 2012).

### **2.3.3. Plijesni**

Plijesni koje se najviše koriste u proizvodnji bioetanola su *Mucor indicus*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus terreus* i *Neurospora crassa*. Njihova je prednost u odnosu na većinu kvasaca i bakterija ta da mogu fermentirati i pentoze i heksoze te samim time ovisno o polaznoj lignoceluloznoj sirovini i njezinom sastavu mogu dati više prinose etanola (Binod i sur., 2013).

#### **2.3.3.1. *Mucor indicus***

*Mucor indicus* je nepatogena, dimorfna plijesan, također poznata kao *Mucor rouxii* (Karimi i Zamani, 2013). Klasifikacija je prikazana u Tablici 2. Raste u tlu, biljkama te na trulom voću i povrću. Bijele je boje, a s vremenom postaje sivo-smeđa. Optimalna temperatura rasta je 28 °C, ali može rasti na temperaturama do 40 °C (Sharifyazd i Karimi, 2017). Optimalna pH vrijednost za rast je u rasponu od 5 – 6,5 (Morin-Sardin i sur., 2016).

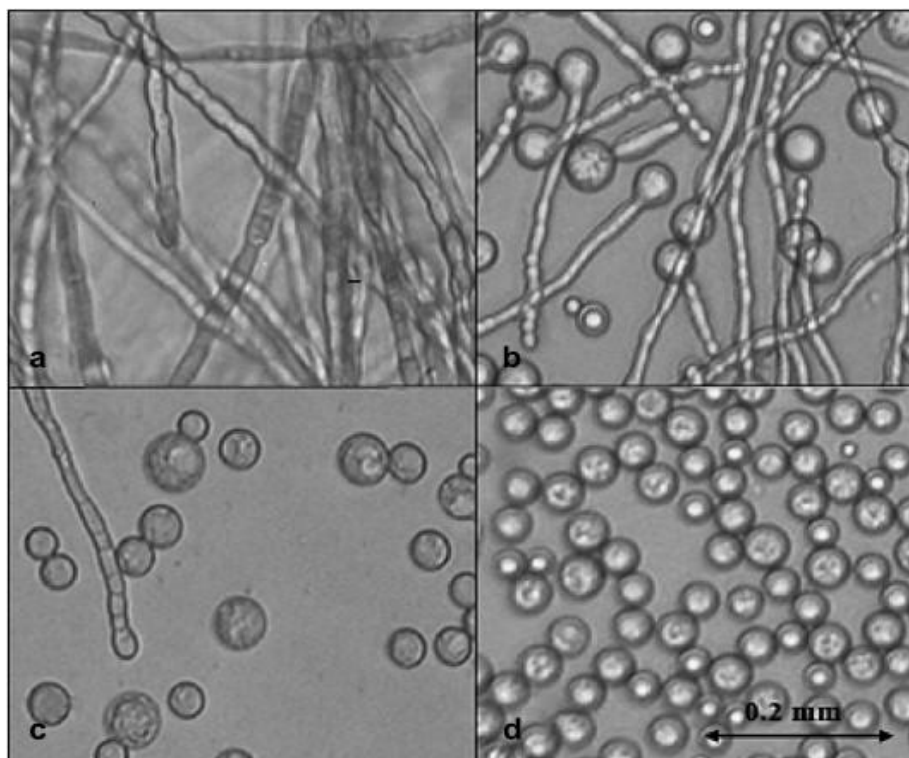
**Tablica 2.** Klasifikacija *Mucor indicus* (Karimi i Zamani, 2013)

<b>Carstvo</b>	<i>Fungi</i>
<b>Koljeno</b>	<i>Zygomycota</i>
<b>Razred</b>	<i>Zygomycetes</i>
<b>Red</b>	<i>Mucorales</i>
<b>Porodica</b>	<i>Mucoraceae</i>
<b>Rod</b>	<i>Mucor</i>
<b>Vrsta</b>	<i>indicus</i>

*Mucor indicus* može rasti u anaerobnim i aerobnim uvjetima. U anaerobnim uvjetima uglavnom raste u obliku kvasca (Slika 5c, 5d), dok u aerobnim uvjetima prevladava rast u obliku filamentoznog micelija (Slika 5a, 5b) (Javanbakht i sur., 2011). Bitan utjecaj na morfologiju ima i pH vrijednost podloge u slučaju kad plijesan raste na aminokiselinama kao izvorima ugljika. Snižavanjem pH vrijednosti usmjerava se rast prema filamentoznim oblicima. Osim o prisustvu kisika i pH vrijednosti podloge, morfologija ovisi i o nizu drugih čimbenika poput početne koncentracije spora, koncentracije šećera u podlozi, atmosferskih utjecaja te o prisutnosti određenih kemikalija (Karimi i Zamani, 2013).

Najveći utjecaj na morfološki oblik plijesni imaju koncentracija i starost inokuluma (Karimi i Zamani, 2013). Sharifia i sur. (2008) proveli su istraživanje utjecaja početne koncentracije spora na morfologiju te dokazali da se pri visokoj početnoj koncentraciji spora u anaerobnim uvjetima razvijaju samo oblici kvasca. U aerobnim uvjetima uz istu početnu koncentraciju razvilo se i nekoliko filamentoznih oblika. Pri nižim početnim koncentracijama rast je bio filamentozan i u aerobnom i anaerobnom načinu uzgoja.





**Slika 5.** Uzgoj *M. indicus* u različitim uvjetima kako bi se postigle različite morfologije: (a) Filamentozni tip rasta, (b) Djelomično filamentozni tip rasta, (c) Djelomičan rast u obliku kvasca, (d) Rast u obliku kvasca (Javanbakht i sur., 2011)

Koncentracija šećera u podlozi također ima utjecaja na morfologiju. Utvrđeno je da glukoza djeluje inhibirajuće na filamentozni rast, odnosno da pri niskim koncentracijama heksoza dolazi do filamentoznog dok pri visokim koncentracijama dolazi do rasta u obliku kvasca (Karimi i Zamani, 2013).

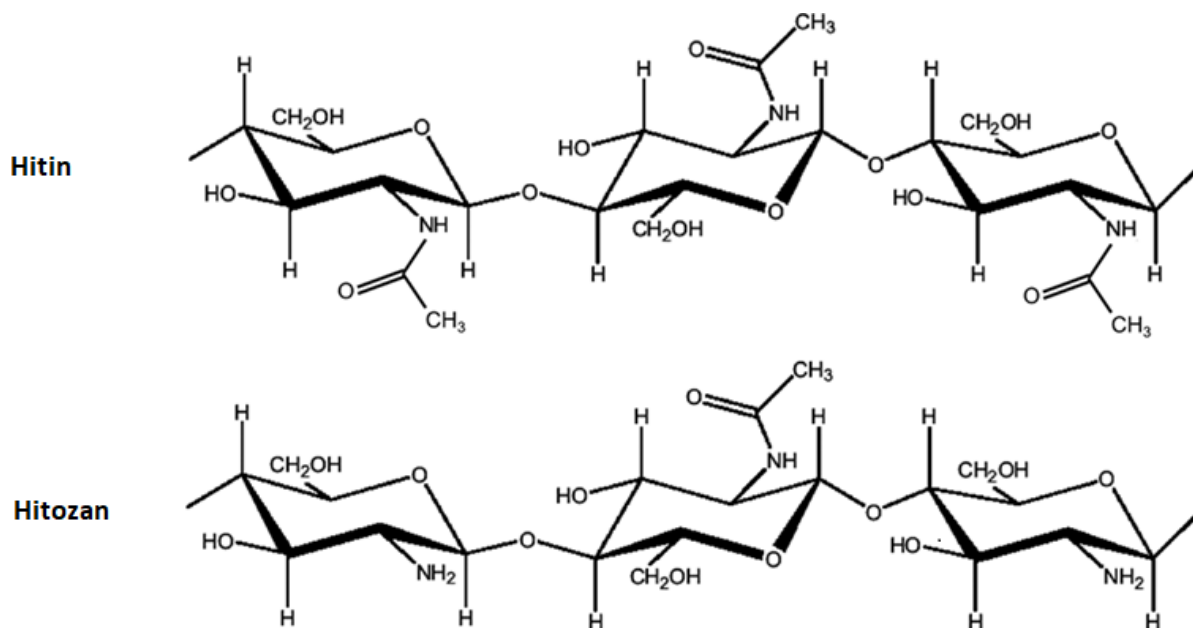
Neovisno o morfološkom obliku te o uvjetima uzgoja, *M. indicus* proizvodi značajne količine etanola, glicerola, hitina, hitozana i lipida, a njegova se upotreba širi na procese uklanjanja toksičnih teških metala, hlapivih organskih spojeva te razgradnju polietilena (Sues i sur., 2005).

*Mucor indicus* je Crabtree pozitivan mikroorganizam, što znači da osim u anaerobnim, proizvodi etanol i u aerobnim uvjetima pri povišenim koncentracijama glukoze (Millati i sur., 2008). Koncentracije etanola proizvedenog fermentacijom s pomoću plijesni *Mucor indicus* mogu se usporediti s koncentracijama dobivenim proizvodnjom s pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Za razliku od *S. cerevisiae* koji može fermentirati isključivo heksoze, *M. indicus* u svim oblicima raste na pentozama, heksozama i na lignoceluloznim hidrolizatima te je tolerantan na inhibitore prisutne u kiselinskim hidrolizatima kao što su

furfural, hidroksimetilfurfural, octena kiselina i vanilin (Karimi i sur., 2008). Također, u aerobnim i mikroaerofilnim uvjetima može fermentirati ksilozu koja je najzastupljeniji šećer u većini lignoceluloznih hidrolizata (Millati i sur., 2005). Iako mnogi mikroorganizmi mogu rasti na ksilozi, rijetki je mogu fermentirati do etanola što se postavlja kao još jedna od prednosti uporabe *M. indicus* za proizvodnju etanola (Karimi i Zamani, 2013).

Što se tiče rasta na saharozi, *M. indicus* nema invertaze, tj. ne može rasti na saharozi te se zbog toga može koristiti za selektivno uklanjanje glukoze i fruktoze iz smjese različitih šećera (melase) kako bi se u otopini dobila kristalizirana saharoza. Međutim, rast na supstratima koji sadrže saharozu moguć je ako je ona prethodno hidrolizirana (Sharifia i sur., 2008).

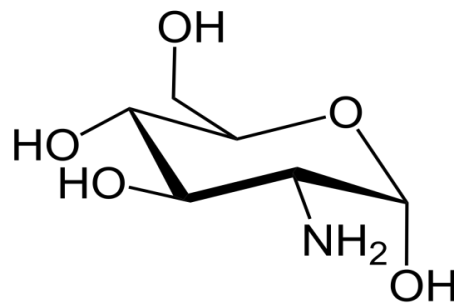
Iako su prinosi etanola u anaerobnim uvjetima nešto viši, uzgojem *M. indicus* u aerobnim uvjetima osim proizvodnje etanola dolazi i do rasta biomase te samim time i sinteze određenih vrijednih proizvoda poput hitina i hitozana (Slika 6.).



**Slika 6.** Struktura hitina i hitozana (Orzali i sur., 2017)

Hitin je bijeli, tvrdi, neelastični polisaharid, prirodni sastojak egzoskeleta člankonožaca (rakova, paukova) i staničnih stijenki gljiva (Ravi Kumar, 2000), dok je hitozan, *N*-deacetilirani derivat hitina, prisutan isključivo u staničnim stijenkama zigomiceta (Mohammadi i sur., 2013). Većina prirodnih polisaharida poput celuloze, dekstrana, pektina,

agara i agaroze imaju neutralna ili kisela svojstva. Međutim, hitin i hitozan su primjeri visoko bazičnih polisaharida. Njihova jedinstvena svojstva uključuju mogućnost stvaranja filmova i gelova te keliranje metalnih iona. Hitin je hidrofoban i netopiv u vodi i većini organskih otapala, a hitozan je topiv u razrijeđenim kiselinama kao što su octena i mravlja kiselina. Oba su spoja građena od glukozamina (Slika 7.), aminomonosaharida prirodno prisutnog u vezivnom tkivu čovjeka, odgovornog za sintezu hijaluronske kiseline te za održavanje fleksibilnosti i elastičnosti vezivnog tkiva zbog čega ima široku primjenu u medicini (Mohammadi i sur., 2013). Uz medicinsku, hitin i hitozan se upotrebljavaju u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te poljoprivredi (Aghbashlo i sur., 2016).



**Slika 7.** Struktura glukozamina (Anonymus 3, 2012)

Glukozamin se dobiva iz hitina i hitozana kemijskom ili enzimskom hidrolizom. Enzimsku hidrolizu ima određene nedostatke kao što su nestabilnost i visoka cijena enzima te nepotpuna hidroliza hitina i hitozana do monomernih jedinica glukozamina. Stoga se u praksi najčešće koristi kemijska hidroliza gdje djelovanjem koncentrirane klorovodične kiseline dolazi do depolimerizacije i deacetilacije početnih spojeva do glukozamin hidroklorida (Soltani i sur., 2017).

*Mucor indicus* svrstava se u oleaginozne plijesni što znači da ima sposobnost nakupljanja lipida i polinezasićenih masnih kiselina s potencijalnom komercijalnom upotrebom u proizvodnji biodizela (Satari i sur., 2016). Osim u proizvodnji biodizela, proizvodnja lipida i masnih kiselina poput linolenske, linoleinske i oleinske ima veliku važnost za farmaceutsku i prehrambenu industriju (Sharifyazd i Karimi, 2017).

## **2.4. Tehnike vođenja procesa proizvodnje bioetanol iz lignocelulozних sirovina**

Proizvodnja bioetanol u biotehnoškom procesu može se voditi pomoću nekoliko različitih tehnika vođenja bioprocasa: odvojena hidroliza i fermentacija (SHF); simultana hidroliza (saharifikacija) i fermentacija (SSF); simultana hidroliza (saharifikacija) i ko-fermentacija (SScF) i integrirani bioproceni sustav (CBP) (Rezić i sur., 2016).

### **2.4.1. Odvojena hidroliza i fermentacija (SHF)**

Vođenje procesa tehnikom odvojene hidrolize i fermentacije najstariji je način proizvodnje etanol. U ovom dvostupanjskom procesu u bioreaktor se dodaju različiti enzimski pripravci u cilju provedbe enzimske hidrolize predobrađene lignocelulozne biomase do monomernih šećera. Dobiveni hidrolizat se zatim u drugom reaktoru koristi kao supstrat za radne mikroorganizme u proizvodnji biogoriva. Dakle, procesi hidrolize i fermentacije se provode odvojeno (Choudhary i sur., 2016). Temperatura hidrolize sirovine se prilagođava optimalnoj temperaturi djelovanja korištenih enzima dok se u drugom stupnju optimalna temperatura bioprocasa prilagođava radnom mikroorganizmu. Prosječno vrijeme trajanja hidrolize je između 24 – 96 h, a alkoholne fermentacije 10 – 24 h (Rezić i sur., 2016).

### **2.4.2. Simultana hidroliza i ko-fermentacija (SScF)**

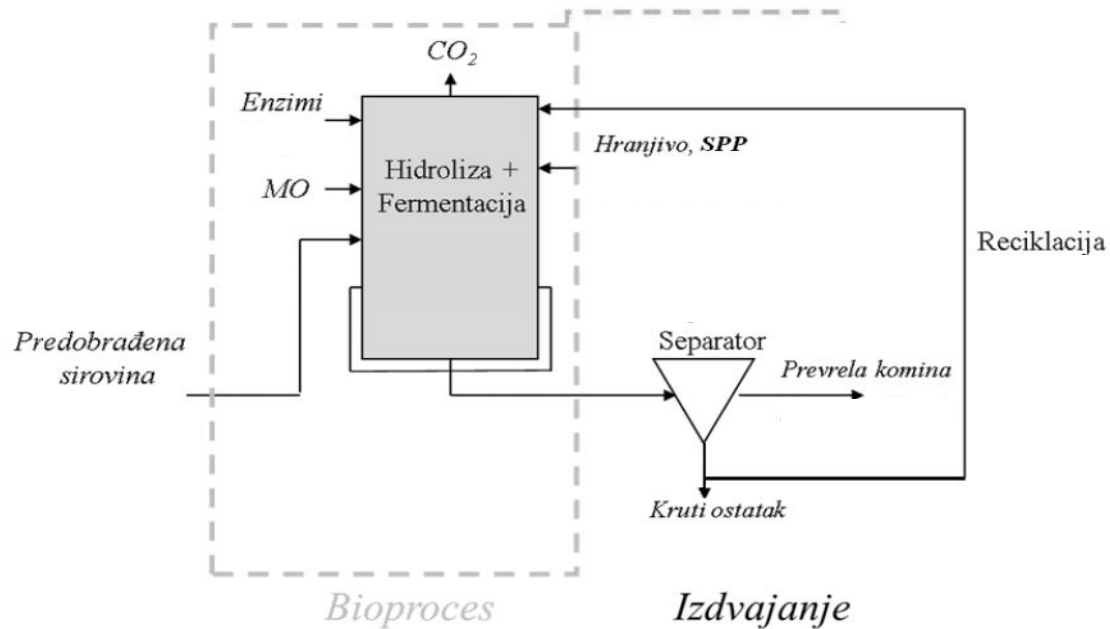
U ovom procesu se hidroliza provodi simultano uz ko-fermentaciju heksoza i/ili pentoza. Takav način proizvodnje nije prikladan za industrijsku proizvodnju etanol gdje se kao radni mikroorganizam najčešće koristi kvasac *Saccharomyces cerevisiae* zbog njegove nemogućnosti asimilacije pentoza. Stoga je prilikom korištenja tehnike simultane hidrolize i ko-fermentacije važno koristiti mikroorganizme koji kao supstrat mogu koristiti pentoze (Choudhary i sur., 2016).

### **2.4.3. Integrirani bioproceni sustav (CBP)**

Integrirani bioproceni sustav je proces u kojem se proizvodnja enzima, hidroliza lignocelulozne biomase i fermentacija provode u jednom koraku. Primjena ovakvog načina proizvodnje ne zahtijeva mnogo bioprocene opreme te je stoga ekonomičnija od proizvodnje tehnikama simultane ili odvojene hidrolize i fermentacije (Choudhary i sur., 2016). Glavni nedostatak ovog koncepta proizvodnje bioetanol je da još uvijek nije pronađen dovoljno učinkovit mikroorganizam koji ima sve potrebne fiziološke i tehnološke karakteristike. Stoga

se fiziološke karakteristike mikroorganizama koji se već koriste u proizvodnji bioetanol nastoje poboljšati primjenom tehnika genetičkog inženjerstva (Rezić i sur., 2016).

#### 2.4.4. Simultana hidroliza i fermentacija



**Slika 8.** Pojednostavljena shema procesa simultane enzimске hidrolize i fermentacije (SSF; MO – mikroorganizam; SPP – sredstvo za suzbijanje pjene) (Rezić i sur., 2016)

Shema procesa simultane saharifikacije i fermentacije prikazana je na Slici 8. Bioprocesi u kojima se simultano provodi hidroliza i fermentacija, u jednom bioreaktoru, imaju veliki potencijal za industrijsku primjenu jer se izbjegava pojava inhibicije supstratom (ili drugim sastojcima hidrolizata sirovine). Jednostavni šećeri (glukoza, ksiloza) oslobođeni enzimskom hidrolizom se ne akumuliraju već se direktno fermentiraju što dovodi do viših prinosa etanola. Osim toga, zbog provođenja procesa u jednom bioreaktoru smanjeni su rizici od kontaminacije (McIntosh i sur., 2017). Nadalje, olakšano je izdvajanje i pročišćavanje proizvoda čime se može bitno poboljšati efikasnost odnosno smanjiti kapitalni i operativni troškovi bioprocesa. Osnovni nedostatak ovog postupka proizvodnje su različiti optimalni uvjeti za enzimsku hidrolizu supstrata i alkoholnu fermentaciju. Budući da se bioprocesi vode kod nižih temperatura od optimalne temperature za aktivnost celulolitičkih enzima, potrebno je primijeniti veće količine enzima za ošećerenje sirovine što poskupljuje proces proizvodnje (Rezić i sur., 2016).

## **2.5. Biogoriva**

Biogoriva su tekuća ili plinska goriva za potrebe prijevoza, proizvedena iz biomase. Biomasa je biorazgradivi dio proizvoda, otpada i ostataka proizvedenih u poljoprivredi (uključujući tvari biljnoga i životinjskoga podrijetla), u šumarstvu i srodnim industrijama, kao i biorazgradivi dio industrijskoga i komunalnoga otpada (NN 141/2005). Najveća prednost biogoriva u odnosu na fosilna goriva je ta da se njihova proizvodnja temelji na korištenju obnovljivih izvora energije (biomase) te u proizvodnji dolazi do smanjene emisije stakleničkih plinova, posebice metana i CO<sub>2</sub> (Rezić, 2012). Proizvodnja biogoriva se može smatrati CO<sub>2</sub> neutralnom budući da se CO<sub>2</sub> oslobođen njihovim izgaranjem utroši tijekom rasta samih sirovina koje se koriste u proizvodnji (Koh i Ghazoul, 2008).

Biogoriva koja se najčešće koriste su bioetanol kao zamjena za benzin, biodizel kao zamjena za dizel te bioplin za proizvodnju električne energije i topline, a njihova se proizvodnja može podijeliti na nekoliko generacija (Rezić, 2012).

### **2.5.1. Biogoriva prve generacije**

Biogoriva prve generacije proizvode se obradom šećernih i škrobnih sirovina poput šećerne trske, šećerne repe i kukuruza kao glavnih sirovina za proizvodnju bioetanola. Osim njih, za proizvodnju biogoriva prve generacije koriste se i pšenica, sirak i manioka. Tehnologija proizvodnje iz sirovina bogatih šećerom se temelji na ekstrakciji jednostavnih šećera iz navedenih sirovina nakon čega dolazi do fermentacije te se u krajnjem koraku provodi destilacija. Škrobne sirovine se prije fermentacije enzimskom hidrolizom pri visokoj temperaturi prevode u jednostavnije šećere, što zahtjeva dodatnu energiju i povisuje troškove proizvodnje. Najveći problem proizvodnje biogoriva prve generacije je taj da njihova proizvodnja konkurrira proizvodnji i cijeni hrane. Nadalje, za njihov uzgoj je potrebno osigurati odgovarajuće poljoprivredne površine, vodu, gnojiva i pesticide koji dodatno povisuju troškove i imaju utjecaj na okoliš (Janda i sur., 2012).

### **2.5.2. Biogoriva druge generacije**

Biogoriva druge generacije su proizvedena iz lignoceluloznih sirovina kao što su ostaci obrađenih prehrambenih proizvoda (stabljike, lišće i ljuške zaostale nakon obrade biljaka, koža i pulpa zaostale nakon prešanja voća), trave, žitarice s malo zrna te otpadci drvne industrije (piljevina) (Janda i sur., 2012). Za razliku od škrobnih i šećernih sirovina,

lignocelulozna biomasa ne zahtijeva ekstenzivnu pripremu zemlje za proizvodnju niti ne konkurrira proizvodnji hrane te nije čimbenik u oscilacijama cijena prehrambenih proizvoda na tržištu (Zvonar, 2016). Osim toga, takve su sirovine dostupnije i jeftinije od šećernih i škrobnih sirovina (Sindhu i sur., 2016). Uz sve navedene prednosti, glavni je nedostatak proizvodnje biogoriva iz lignoceluloznih sirovina kompleksni sastav same sirovine koji zahtijeva značajno zahtjevniju tehnološku obradu. Zbog takve su građe potrebni procesi predobrade, a predobrađena sirovina sadrži različite tvari (inhibitore, šećere koje radni mikroorganizam ne može prevesti u biogoriva) koje negativno utječu na prinos, brzinu i produktivnost bioprocasa (Rezić, 2012).

### **2.5.3. Biogoriva treće generacije**

Biogoriva treće generacije proizvode se iz biomase algi. Fotosintetski mikroorganizmi poput mikroalgi za svoj rast i proizvodnju lipida i ugljikohidrata uglavnom zahtijevaju svjetlo, ugljikov dioksid i neke nutrijente (dušik, fosfor i kalij). Korištenjem algi izbjegavaju se navedeni nedostaci prve i druge generacije biogoriva (Behera i sur., 2015).

## **2.6. Bioetanol**

Bioetanol je tekuće biogorivo dobiveno procesom fermentacije iz biomase (Gray i sur., 2006). Sirovine za proizvodnju bioetanola mogu se podijeliti u tri osnovne skupine – šećerne, škrobne i lignocelulozne.

Bioetanol se uglavnom proizvodi iz šećernih i škrobnih sirovina poput šećerne trske i kukuruza (Janda i sur., 2012). Prema istraživanju Organizacije za prehranu i poljoprivredu (FAO) cijene hrane su se 2007. i 2008. godine uvećale za oko 40 %, a najveći su porasti zamijećeni kod sirovina koje su se ujedno koristile i za proizvodnju bioetanola (Rosegrant, 2008). Rosegrant (2008) nadalje objašnjava porast cijena zbog proizvodnje etanola iz kukuruza. Zbog veće potražnje kukuruza kao sirovine za proizvodnju etanola, njegova je cijena porasla, stimulirajući pritom rast cijena i ostalih žitarica. Industrija biogoriva nudila je veću profitabilnost od prehrambene industrije čime je došlo do nestašice i porasta cijena hrane. Očekivano, najveći je porast zapažen kod cijena kukuruza od čak 39 %, te riže i pšenice za 21 %, odnosno 22 %. Zbog toga se danas sve više istražuje i promovira proizvodnja etanola iz lignoceluloznih sirovina te iz biomase algi.

Osim što je upotreba bioetanola kao goriva CO<sub>2</sub> neutralna te samim time manje zagađuje okolinu ispušnim plinovima, etanol ima još neke prednosti u odnosu na benzin. Molekula etanola sadrži 35 % više kisika od benzina, što pospješuje kompletno sagorijevanje goriva i tako smanjuje emisiju čestica u okolinu (Chandel i sur., 2013). Također, etanol ima veći oktanski broj u odnosu na benzin (Tablica 3.), veću toplinu isparavanja te manju toplinu sagorijevanja. Dodatak etanola benzinu utječe na oktanski broj, sadržaj kisika, hlapljivost i topljivost u vodi. Dodatkom 10 % (vol/vol) etanola benzinu povećava se oktanski broj goriva za 3 – 4 jedinice (Ivančić Šantek i sur., 2016). Nadalje, toplina isparavanja etanola iznosi 907 J g<sup>-1</sup> dok je toplina isparavanja benzina 395 J g<sup>-1</sup>. Kombinacija visokog oktanskog broja i visoke topline isparavanja omogućuje više iskorištenje etanola kao goriva u odnosu na benzin. Usporedba fizikalno-kemijskih karakteristika bioetanola i benzina dana je u Tablici 3. Uz navedene prednosti, uporaba etanola kao goriva ima i neke nedostatke. Budući da etanol zahtijeva manje kisika za sagorijevanje od benzina, može se koristiti samo u posebno konstruiranim motorima ili *flexy-fuel* automobilima, a visoki oktanski broj ujedno znači i niski cetanski broj što ga čini nepovoljnim za uporabu u dizelskim motorima (Wyman i sur., 2019).

**Tablica 3.** Usporedba svojstava etanola i benzina (Ivančić Šantek i sur., 2016)

Svojstva	Etanol	Benzin
<b>Kemijski sastav</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Ugljikovodici C <sub>4</sub> – C <sub>12</sub>
<b>Molarna masa / g mol<sup>-1</sup></b>	46,07	100 - 105
<b>Oktanski broj</b>	108	88 - 100
<b>Gustoća / kg dm<sup>-3</sup></b>	0,79	0,69 – 0,79
<b>Donja ogrijevna vrijednost / 10<sup>3</sup> kJ dm<sup>-3</sup></b>	21,1	30 - 33
<b>Vrelište / °C</b>	78	27 - 225
<b>Plamište / °C</b>	13	-43
<b>Latentna toplina isparavanja / kJ kg<sup>-1</sup></b>	854	289
<b>Topljivost u vodi</b>	topljiv	netopljiv

Bioetanol se može koristiti kao čisto gorivo (u posebno konstruiranim motorima) ili u smjesi s benzinom (Semenčenko i sur., 2011). U smjesama s benzinom upotrebljava se bezvodni etanol minimalne čistoće od 99,5 – 99,8 % ( $\varphi$ ). Udjel etanola u smjesi s benzinom



iznosi od 5 do 85 % (naziv goriva E5 – E85). Smjesa 85 % etanola i 15 % benzina (E85) upotrebljava se samo u SAD-u i nekoliko europskih država, najviše Švedskoj. U Brazilu se kao pogonsko gorivo upotrebljava etanol koji sadrži oko 5 % vode (E100) (Ivančić Šantek i sur., 2016). Smjese s nižim volumnim udjelom bioetanola su kompatibilne s konvencionalnim motorima, dok smjese s više od 30 % etanola zahtijevaju modifikacije motora (Semenčenko i sur., 2011).

Svjetska proizvodnja bioetanola 2000. godine bila je 4,5 milijardi galona (1 galon = 3,785 L) te od tada proizvodnja ubrzano raste pa je tako 2010. godine proizvedeno 23,3 milijarde, a u 2013-toj godini 23,4 milijarde galona bioetanola sa 56,8 %, 26,7 %, 5,9 %, 3,0 % i 2,1 % proizvodnje u SAD-u, Brazilu, Europi, Kini i Kanadi (Guo i sur., 2015). Prema podacima iz 2018-te godine, ukupno je proizvedeno 28,57 milijardi galona bioetanola sa 16,061 milijardi galona (56 %) proizvedenih u SAD-u kao vodećem proizvođaču, nakon kojeg slijede Brazil sa 7,92 % i Europska Unija s 5 % proizvodnje (RFA, 2018). Međutim, iako je godišnja proizvodnja bioetanola u porastu, proizvedena količina još uvijek predstavlja minimalni udio u godišnjoj potrošnji fosilnih goriva od 3,8 bilijuna litara (Morales i sur., 2015). Budući da uporaba sirovina prve generacije koje se danas pretežito koriste u proizvodnji bioetanola utječe na prehrambenu industriju i poljoprivredu, proizvođači se okreću novim tehnologijama i izvorima sirovina, odnosno proizvodnji bioetanola na lignoceluloznim sirovinama (Correa i sur., 2019).

EKSPERIMENTALNI DIO

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Sirovina

Lignocelulozna sirovina korištena u ovom radu bili su kiselinski predobrađeni, isprani i samljeveni kukuruzni oklasci s područja sjeverozapadne Hrvatske, tretirani slabom sumpornom kiselinom (0,5 % vol/vol) u visokotlačnom reaktoru pri 180 °C kroz 10 minuta. Predtretmani kukuruznih oklasaka provedeni su u okviru HRZZ projekta „*Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina*“. Nakon predtretmana, sirovina je usitnjena i korištena u daljnjim procesima. Na Slici 9. prikazani su kukuruzni oklasci prije procesa predobrade.



**Slika 9.** Izgled cijelih kukuruznih oklasaka (Gelenčir, 2019)

##### 3.1.2. Radni mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam korištena je plijesan *Mucor indicus* iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

### 3.1.3. Kemikalije

Kemikalije korištene u ovom radu navedene su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Kemikalije korištene u istraživanju

<b>Naziv</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>Glukoza</b>	Difco, SAD
<b>Sladni agar</b>	Difco, SAD
<b>Kvašćev ekstrakt</b>	Roth, Australija
<b>Diamonijev fosfat</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Diamonijev sulfat</b>	Kemika, Hrvatska
<b>Sumporna kiselina</b>	Acros Organics, Belgija
<b>Fosfatna kiselina</b>	Fluka, Njemačka
<b>Octena kiselina</b>	Merck, Njemačka
<b>Natrijev acetat trihidrat</b>	Merck, Njemačka
<b>Natrijev klorid</b>	Solana Nin, Hrvatska
<b>Cinkov sulfat heptahidrat</b>	Merck, Njemačka
<b>Tween</b>	Merck, Njemačka
<b>Bakrov sulfat pentahidrat</b>	Merck, Njemačka
<b>Etanol</b>	Gram-mol, Hrvatska
<b>Natrijev hidroksid</b>	Merck, Njemačka
<b>Klorovodična kiselina</b>	Merck, Njemačka

### **3.1.4. Enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka**

Enzimaska hidroliza predobrađenih, usitnjenih kukuruznih oklasaka provedena je u acetatnom puferu (Poglavlje 3.1.4.1.) i u podlozi (Poglavlje 3.1.4.2.) koja će se koristiti za uzgoj plijesni *M. indicus* tijekom procesa simultane saharifikacije i fermentacije. Enzimaska hidroliza provedena je u šest Erlenmayer tikvica korisnog volumena 50 mL. svaka je sadržavala 40 g L<sup>-1</sup> predobrađenih kukuruznih oklasaka (supstrat). Tri tikvice sadržavale su supstrat i 50 mL pripremljenog acetatnog pufera, a u preostale tri tikvice pripremljena je podloga prema zadanim koncentracijama te je dodano 50 mL demineralizirane vode.

#### **3.1.4.1. Priprema acetatnog pufera**

Za pripremu acetatnog pufera korištene su 0,2 M otopina octene kiseline (otopina A) i otopina natrijeva acetata trihidrata (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na·3H<sub>2</sub>O; otopina B). Otopina A pripremljena je dodavanjem 5,78 mL octene kiseline u 0,5 L demineralizirane vode. Otopina B pripremljena je dodavanjem 13,6 g natrijeva acetata trihidrata u 0,5 L demineralizirane vode. Zatim je acetatni pufer pripremljen u Erlenmayer tikvici od 250 mL dodatkom 74 mL otopine A i 176 mL otopine B.

#### **3.1.4.2. Priprema podloge**

Enzimaska hidroliza provedena je u podlozi kakva će se koristiti za uzgoj plijesni *M. indicus* kako bi se usporedila aktivnost enzima u puferu i podlozi. Za pripremu podloge korištene su kemikalije u sljedećim koncentracijama: 5 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, 2 g L<sup>-1</sup> diamonijeva fosfata, 2 g L<sup>-1</sup> diamonijeva sulfata i 40 g L<sup>-1</sup> kemijski predobrađenih, usitnjenih i ispranih kukuruznih oklasaka kao supstrata. pH podloge podesi se na 5,0.

#### **3.1.4.3. Enzimi korišteni za enzimsku hidrolizu predobrađenih kukuruznih oklasaka**

Za hidrolizu kiselinski predobrađenih, samljevenih kukuruznih oklasaka korišteni su komercijalni enzimi Viscozyme (u koncentraciji od 10 % vol/vol) i Cellulase Blend (u koncentraciji od 10 % vol/vol) te njihova kombinacija (5 % (vol/vol) Viscozyme i 2 % (vol/vol) Cellulase Blend).

Komercijalni enzimski pripravak Viscozyme sadrži različite enzime uključujući arabinaze, celululaze, β-glukanaze, hemicelulaze i ksilanaze. Osim celuloze i hemiceluloze, djeluje i na pektin u staničnim stijenkama biljaka. Optimalni uvjeti za ovu skupinu enzima su temperatura u rasponu od 25 – 55 °C i pH od 3,3 – 5,5.

Cellulase Blend sadrži celuloze,  $\beta$ -glukozidaze i hemiceluloze. Optimalni uvjeti za ove enzime su pH vrijednost 5 i temperatura 50 °C.

Svaki je enzim (i njihova kombinacija) dodan u po jednu tikvicu s puferom i jednu s podlogom. Proces se vodio 48 sati na magnetnoj miješalici pri broju okretaja od 160 o min<sup>-1</sup> na 20, 30 i 40 °C.

### **3.1.5. Enzimi korišteni za proces proizvodnje etanola uz *Mucor indicus* tehnikom simultane saharifikacije i fermentacije**

Za hidrolizu kiselinski predobrađenih, samljevenih kukuruznih oklasaka u procesu simultane saharifikacije i fermentacije korišten je komercijalni enzimski pripravak Cellulase Blend u koncentraciji od 4 % (vol/vol).

### **3.1.6. Hranjive podloge za održavanje i uzgoj plijesni *Mucor indicus***

#### **3.1.6.1. Hranjiva podloga za održavanje čiste kulture**

Čista kultura plijesni *Mucor indicus* održavana je na čvrstim podlogama sa sladnim agarom sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): sladni ekstrakt 6; maltoza 1,8; glukoza 6,0; kvašćev ekstrakt 1.2 .

#### **3.1.6.2. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma**

Za uzgoj inokuluma pripremljena je hranjiva podloga koja je sadržavala: 20 g L<sup>-1</sup> glukoze, 10 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta, 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog fosfata, 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog sulfata. Uzgoj inokuluma proveden je u Erlenmayer tikvicama, a ukupni volumen podloge iznosio je 250 mL.

#### **3.1.6.3. Hranjiva podloga za uzgoj u Erlenmayer tikvicama i u bioreaktoru s miješalom tehnikom simultane enzimske saharifikacije i fermentacije**

Za uzgoj *M. indicus* u Erlenmayer tikvicama procesom simultane enzimske saharifikacije i fermentacije kao izvor ugljika korišteni su predobrađeni kukuruzni oklasci u koncentraciji od 40 g L<sup>-1</sup>. Uzgoj se provodio u acetatnom puferu (Poglavlje 3.1.4.1.), a druga u podlozi opisanoj u Poglavlju 3.1.4.2. Za uzgoj u bioreaktoru koristila se podloga čiji je sastav opisan u Poglavlju 3.1.4.2. Uzgoj se provodio u bioreaktoru s miješalom volumena 1,5 L. pH podloge podešen je na 5,0. Nakon pripreme podloge, reaktor je nadpunjen demineraliziranom vodom do konačnog volumena, a proces se vodio tehnikom simultane enzimske saharifikacije i fermentacije.

## **3.2. Uređaji i oprema**

### **3.2.4. Uređaj za visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju (HPLC)**

Uređaj za visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju (Shimadzu CLASS-VP LC-10A; Shimadzu; Kyoto, Japan) sastoji se od: crpke (LC-10ADVP), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10ADVP), uređaja za grijanje kolone (CTO-10AVP), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel<sup>TM</sup> C-610H; 30 cm x 7,8 mm i.d., 9 μm; SigmaAldrich Co. (LLC), St. Louis, SAD) s predkolonom (Supelcogel<sup>TM</sup> H; 5 cm x 4,6 mm i.d., 9 μm; SigmaAldrich Co. (LLC), St. Louis, SAD), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10AVP) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP). Kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina fosfatne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 20 μL.

### **3.2.5. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC)**

Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) sastoji od: crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), injektora (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 μL, a protok mobilne faze 1 mL min<sup>-1</sup>.

### **3.2.6. Bioreaktor s miješalom**

Za proces simultane saharifikacije i fermentacije korišten je bioreaktor s miješalom korisnog volumena 1,5 L. Hranjiva podloga i bioreaktor sterilizirani su zajedno indirektno pomoću vodene pare. Bioreaktor je staklena posuda dimenzija 15 x 30 cm gdje se izmiješavanje podloge provodi sa zrakom preko prstenaste sapnice promjera 5 cm koja je udaljena 2 cm od dna bioreaktora. Protok kroz prstenastu sapnicu kontrolira se preko aerometra i iznosio je 4 L min<sup>-1</sup>. Bioreaktor je povezan s komandnom pločom (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Njemačka) za automatsku regulaciju temperature te pH vrijednosti. Otvori preko kojih se provela inokulacija te iz kojih su se periodično uzimali uzorci za analizu nalaze se na gornjoj podnici bioreaktora zajedno s filterom za aeraciju podloge.

### 3.2.7. Ostali uređaji

Uz laboratorijsko posuđe i potrošni laboratorijski materijal u izradi ovog rada korištena je i oprema navedena u Tablici 5.

**Tablica 5.** Popis uređaja korištenih u izradi rada

<b>Oprema</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>Centrifuga</b>	Harrier 18/80, Sanyo, Velika Britanija Beckman, Model J-21B
<b>Tresilica</b>	RM 71 B. Braun Biotech. International, Sartorius Group, Njemačka
<b>Sušionik</b>	Instrumentaria ST-50, Hrvatska
<b>Tehnička vaga</b>	Technica ET – 1111, Slovenija
<b>Analitička vaga</b>	Shimadzu, AX-200 W/O AC ECTA, Japan
<b>UV/VIS spektrofotometar</b>	Cary 100, UV-VIS; Agilent Technologies
<b>Kvarcne kivete promjera 10 mm</b>	Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka
<b>Oprema za filtraciju otopina</b>	Najlonski filteri (0,22 µm, 47 mm; Magna, GE Water & Process Technologies, Michigan, SAD
<b>Magnetska miješalica</b>	Tehnica ET – 1111, Slovenija
<b>Autoklav</b>	Sutjeska, Beograd, Jugoslavija
<b>Mlinac za kavu SCG 3050SS</b>	Sencor, Japan
<b>Hladnjak i zamrzivač</b>	Bosch, Njemačka



### 3.3. Metode

#### 3.3.4. Određivanje sastava početne sirovine dvostrukom kiselinskom hidrolizom

Analiza sastava predobrađenih kukuruznih oklasaka provedena je prema NREL metodi (Sluiter i sur., 2012). Ovom metodom analiziran je sastav samljevene sirovine nakon predobrade oklasaka u visokotlačnom reaktoru zbog određivanja koncentracije lignina topivog i netopivog u kiselini te koncentracije ukupnih furana. U tikvicu s okruglim dnom dodano je po 0,4 g uzorka i 4 mL 72 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sadržaj tikvice je promiješan protresanjem kako bi sva sirovina bila u kontaktu s kiselinom. Nakon jednog sata inkubacije tikvice na 30 °C, dodano je 112 mL demineralizirane vode te se sirovina kuhala 4 sata uz povratno hladilo. Sadržaj tikvice povremeno je promiješan protresanjem tikvice kako bi se minimalizirali gubici uslijed hvatanja sirovine na stijenke tikvice. Nakon kuhanja, sirovina je ohlađena pod mlazom vode i profiltrirana vakuum filtracijom kroz celulozni filter preko Buchnerovog lijevka. U zaostalom čvrstom dijelu sirovine na filter papiru određen je lignin netopiv u kiselini, a u filtratu koncentracija furana i lignina topivog u kiselini te sastav ugljikohidrata.

#### 3.3.5. Određivanje udjela netopivog lignina

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

#### 3.3.6. Određivanje topivog lignina

Od permeata filtracije nakon kiselinske hidrolize je izdvojen alikvot za određivanje topivog lignina spektrofotometrijom. Uzorku je snimljena apsorbanacija pri 205 nm. Zbog točnosti mjerenja i određivanja koncentracija, uzorak je pripremljen uz zadovoljavajuće razrjeđenje demineraliziranom vodom kako bi mu apsorbanacija iznosila između 0,7 i 1.

$$LTK = \frac{A * D * V}{\alpha * b * m'}$$

A – apsorbanacija uzorka; D = faktor razrjeđenja; V – volumen filtrata;  $\alpha$  = konstanta, 110 g L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; b = širina kivete, 1 cm, m – masa uzorka

### 3.3.7. Ukupni furani

Izdvojeni je alikvot (9  $\mu$ L) tekućeg dijela nakon hidrolize kiselinom razrijeđen tisuću puta demineraliziranom vodom (9 mL) i snimljena mu je apsorbancija spektrofotometrom pri 284 nm i 320 nm. Razlika ovih dvaju vrijednosti je uzeta za računanje ukupnih furana čija se koncentracija određuje iz jednadžbe baždarnog pravca ( $\gamma_{furfural} = 2,469 * \Delta A + 0,0158R^2$ ;  $R^2 = 0,9998 \approx 1$ ).

### 3.3.8. Enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka

Predobrađena usitnjena lignocelulozna sirovina podvrgnuta je enzimskoj hidrolizi u tikvici. Ukupno je pripravljeno šest tikvica. Koncentracija suhe tvari sirovine u svakoj iznosila je 40 g L<sup>-1</sup>. Tri tikvice su uz sirovinu sadržavale 50 mL acetatnog pufera, a preostale tri 50 mL demineralizirane vode i 5 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta te po 2 g L<sup>-1</sup> diamonijevog fosfata i diamonijevog sulfata. Za hidrolizu su korišteni komercijalni enzimi Viscozyme (u koncentraciji od 10 %) i Cellulase Blend (u koncentraciji od 10 %) te njihova kombinacija (5 % Viscozyme i 2 % Cellulase Blend). Reakcija se provodila kroz 48 h na različitim temperaturama (20, 30 i 40 °C) uz miješanje na magnetnoj miješalici pri 160 o min<sup>-1</sup>.

### 3.3.9. Uzgoj čiste kulture plijesni

Kultura plijesni *Mucor indicus* uzgojena je na čvrstoj podlozi sa sladnim agarom. Podloge su pripremljene otapanjem 20 g L<sup>-1</sup> agara u Erlenmayer tikvici volumena 500 mL. Nakon formiranja spora (3 – 4 dana) kultura je čuvana na +4 °C. Suspenzija spora plijesni dobivena je dodavanjem prethodno pripremljene otopine Tween-a (0,5 – 1 mL Tween-a i 0,9 % NaCl u Erlenmayer tikvici od 250 mL) . Nakon dodatka otopine Tween-a, spore se ostružu Drigalski štapićem te se precijepe na novu podlogu.

### 3.3.10. Uzgoj inokuluma

Kultura plijesni *Mucor indicus* uzgojena je na podlozi pripremljenoj na način opisan u Poglavlju Materijali (3.1.6.2.). S čvrste podloge na kojoj je uzgojena kultura plijesni (Poglavlje 3.3.6.) mikrobiološkom ušicom se izreže dio podloge zajedno sa sporama te se u aseptičnim uvjetima prenese u tikvicu s pripremljenom podlogom za uzgoj inokuluma. Inokulum je uzgajan na tresilici pri 140 okretaja po minuti, pri temperaturi od 28 °C kroz 2 do 3 dana.

### **3.3.11. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* u tikvicama na predobrađenim kukuruznim oklascima**

Izdvojeni čvrsti dio nakon predtretmana kukuruznih oklasaka korišten je kao izvor ugljika za uzgoj plijesni *Mucor indicus* procesom simultane saharifikacije i fermentacije. Uzgoj je proveden u Erlenmayer tikvicama na tresilici ( $140 \text{ o min}^{-1}$ ) kroz 72 h na različitim temperaturama (20, 30 i 40 °C). Korištene su tikvice volumena 500 mL u kojima je volumen sterilne hranjive podloge (način pripreme opisan u Poglavlju Materijali, 3.1.6.3.) iznosio 250 mL. Tikvice su nacijejpljene s kulturom plijesni *Mucor indicus* volumena 20 mL (8 % volumena podloge). Osim inokuluma, u tikvice je dodano i 10 mL enzima Cellulase Blend. Tijekom uzgoja, svakih se sat vremena uzimalo uzorke i provodila se analiza prevrele podloge s ciljem određivanja količine proizvedenog etanola i koncentracije glukoze i ksiloze. Sadržaj tikvica filtrirao se vakuum filtracijom, a filtracijski kolač (biomasa plijesni i ostaci sirovine) je podvrgnut daljnjoj analizi.

### **3.3.12. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* u bioreaktoru s miješalom**

Za uzgoj plijesni *Mucor indicus* i provedbu procesa simultane saharifikacije i fermentacije korišten je bioreaktor s miješalom (Poglavlje 3.2.3.). Hranjiva podloga (Poglavlje 3.1.6.4.) i bioreaktor sterilizirani su zajedno, indirektno pomoću vodene pare na 121 °C kroz 30 minuta. Ukupni volumen hranjive podloge bio je 1,5 L. Volumen inokuluma iznosio je 120 mL, a volumen enzima Cellulase Blend 60 mL. Uzgoj se provodio 48 h pri 30 °C, u aerobnim uvjetima uz protok zraka od  $4 \text{ L min}^{-1}$  i broj okretaja miješala  $200 \text{ o min}^{-1}$ .

### **3.3.13. Izolacija glukoamina**

#### **3.3.13.1. Uklanjanje proteina iz biomase**

Proces izolacije glukoamina proveden je prema radu Soltani i sur. (2017). Za uklanjanje proteina i lipida iz porasle biomase koristi se 0,5 M natrijev hidroksid. Na gram biomase dodaje se 30 mL natrijeva hidroksida, nakon čega se smjesa sterilizira na 121 °C kroz 20 minuta. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, centrifugiranjem ( $4000 \text{ o min}^{-1} / 5 \text{ min}$ ) se izdvoji materijal netopiv u lužini (Alkali Insoluble Material – AIM). Talog se neutralizira ispiranjem demineraliziranom vodom te se zamrzne.

#### **3.3.13.2. Uklanjanje fosfata iz materijala netopivog u lužini (AIM)**

Za uklanjanje fosfata, talog se tretira 0,05 M otopinom sumporne kiseline (100 mL otopine po gramu osušenog taloga) na sobnoj temperaturi kroz 30 minuta. Preostali talog se

izdvoji od supernatanta centrifugiranjem te se neutralizira demineraliziranom vodom do neutralnog pH i zamrzne.

### **3.3.13.3. Izolacija glukozamin hidroklorida**

0,5 g materijala netopivog u lužini koji više ne sadrži fosfate (PFAIM – Phosphate Free Alkali Insoluble Material) samljeveno je u tarioniku. Dobivenom preparatu dodano je 75 mL klorovodične kiseline (2 M) nakon čega se preparat kuhao 5 sati na 110 °C. Nakon zaustavljanja reakcije i hlađenja do sobne temperature, neizreagirani dio se filtrira. Filtrat se prebaci u staklenu Petrijevu zdjelicu te se stavi pod laminarnu struju zraka kako bi kiselina isparila. Nakon neutralizacije dobivenog filtrata, uzorci su analizirani UPLC metodom.

### **3.3.14. Analiza uzoraka visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC)**

HPLC metodom analizirani su uzorci izuzimani tijekom procesa enzimske hidrolize opisanog u Poglavlju 3.3.5. radi praćenja koncentracije glukoze i ksiloze. Prije same analize, uzorci su centrifugirani kako bi se supernatant izdvojio od taloga. Nakon toga, supernatant je u omjeru 1:1 (vol/vol) pomiješan s 10 % - tnom otopinom  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$  kako bi se istaložili proteini. Taloženje se provodilo 10 minuta, a zatim su se istaloženi proteini uklonili ponovnim centrifugiranjem. Naposljetku, supernatant je filtriran u vijalice kroz filter za šprice veličine pora 0,22  $\mu m$ . Zatim su pripremljeni uzorci podvrgnuti HPLC analizi. Kao mobilna faza tijekom analize korištena je otopina fosfatne kiseline u vodi (0,1 % vol/vol), temperatura kolone iznosila je 55 °C, tlak 30 bara, a injektirano je po 20  $\mu L$  uzorka uz brzinu protoka mobilne faze od 0,5 mL  $min^{-1}$ . Iz jednadžbi baždarnih dijagrama danih u Prilogu 7.1. izračunate su koncentracije šećera i etanola u analiziranim uzorcima.

### **3.3.15. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti (UPLC)**

UPLC metodom analizirani su uzorci izuzimani tijekom procesa uzgoja plijesni *Mucor indicus* u Erlenmayer tikvicama i u bioreaktoru s miješalom. Prije same analize, uzorci su centrifugirani kako bi se supernatant izdvojio od taloga. Nakon toga, supernatant je u omjeru 1:1 (vol/vol) pomiješan s 10 % - tnom otopinom  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$  kako bi se istaložili proteini. Taloženje se provodilo 10 minuta, a zatim su se istaloženi proteini uklonili ponovnim centrifugiranjem. Naposljetku, supernatant je filtriran u vijalice kroz filter za šprice veličine pora 0,20  $\mu m$ . Zatim su pripremljeni uzorci podvrgnuti UPLC analizi. Kao mobilna faza tijekom analize korištena je otopina sumporne kiseline u vodi (0,0025 M), temperatura pećnice iznosila je 60 °C, temperatura RID detektora 40 °C, tlak 40 bara, a injektirano je po

10  $\mu\text{L}$  uzorka uz brzinu protoka mobilne faze od  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ . Iz jednadžbi baždarnih dijagrama danih u Prilogu 7.2. izračunate su koncentracije šećera i etanola u analiziranim uzorcima.

### 3.4. Određivanje parametara uspješnosti tijekom uzgoja plijesni *Mucor indicus*

#### 3.4.2. Prinos produkta ( $Y_p$ )

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

$P_0$  – početna koncentracija produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$P$  – konačna koncentracija produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ]

#### 3.4.3. Produktivnost ( $Pr$ )

$$Pr = \frac{Y_p}{t_u} \quad [\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}]$$

$Y_p$  – prinos produkta [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$t_u$  – ukupno vrijeme bioprocesa [h]

## REZULTATI I RASPRAVA

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu proveden je uzgoj plijesni *Mucor indicus* na lignoceluloznoj biomasi odnosno na kiselinski predobrađenim kukuruznim oklascima tehnikom simultane saharifikacije i fermentacije u svrhu dobivanja vrijednih bioproizvoda poput etanola i glukozamina. Prethodno samljeveni oklasci su predobrađeni kiselinom u visokotlačnom reaktoru. Za predobradu je korištena slaba sumporna kiselina (0,5 % vol/vol) pri temperaturi od 180 °C uz vrijeme zadržavanja od 10 minuta. Sastav čvrstog, ispranog djela zaostalog nakon predobrade kukuruznih oklasaka određen je dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom, a rezultati su prikazani u Poglavlju 4.1.

Prije samog uzgoja provedena je enzimska hidroliza kiselinski predobrađenih, ispranih i usitnjenih kukuruznih oklasaka u acetatnom puferu i u podlozi koja će se koristiti za uzgoj radnog mikroorganizma postupkom simultane saharifikacije i fermentacije pri različitim temperaturama (20, 30 i 40 °C) uz dva enzimska pripravka, Viscozyme u koncentraciji od 10 % (vol/vol) i Cellulase Blend u koncentraciji od 10 % (vol/vol) te njihovom kombinacijom s 2 % (vol/vol) Cellulase Blend-a i 5 % (vol/vol) Viscozyme-a (Poglavlje 4.2.). Nakon provedenog procesa, ustanovljeno je da se najveći postotak hidrolize sirovine postiže sa Cellulase Blend enzimskim pripravkom te je on korišten u daljnjim uzgojima plijesni *M. indicus* u Erlenmayer tikvicama i bioreaktoru s miješalom tehnikom simultane saharifikacije i fermentacije.

Uzgoj radnog mikroorganizma na kiselinski predobrađenim, ispranim i usitnjenim kukuruznim oklascima tehnikom simultane saharifikacije i fermentacije proveden je u Erlenmayer tikvicama (500 mL) na tresilici pri različitim temperaturama (30 i 40 °C). U tikvice je dodan komercijalni enzimski pripravak Cellulase Blend u koncentraciji od 4 % (vol/vol).

Uzgoj plijesni *Mucor indicus* u većem mjerilu proveden je u bioreaktoru s miješalom opisanom u Poglavlju 3.2.6. (Materijali i metode). Proces je vođen aerobno kroz 48 sati uz protok zraka od 4 L min<sup>-1</sup>, broj okretaja miješala 200 o min<sup>-1</sup> te na temperaturi od 30 °C. Nakon provedenog uzgoja odredila se koncentracija supstrata i produkata. Rezultati su prikazani u Poglavlju 4.4.

#### 4.1. Određivanje sastava početne sirovine dvostrukom kiselinskom hidrolizom

U ovom poglavlju prikazani su rezultati dvostupanjske kiselinske hidrolize čvrstog djela zaostalog nakon kiselinske predobrade kukuruznih oklasaka opisane u Poglavlju 3.3.4. (Materijali i metode). Analizom dobivenog hidrolizata visoko djelotvornom tekućinskom kromatografijom (Poglavlje 3.3.14, Materijali i metode) određen je sastav čvrste faze zaostale nakon predobrade kukuruznih oklasaka, a rezultati su prikazani u Tablici 6.

**Tablica 6.** Sastav predobrađenih kukuruznih oklasaka određen dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom

<b>Sirovina</b>	<b><math>w_{\text{glukan}}</math></b> [%]	<b><math>w_{\text{ksilan}}</math></b> [%]	<b><math>w_{\text{arabinan}}</math></b> [%]	<b><math>w_{\text{LTK}}</math></b> [%]	<b><math>w_{\text{NLTK+pepeo}}</math></b> [%]	<b>Furani</b> [mg L <sup>-1</sup> ]
<b>Predtretirani kukuruzni oklasci</b>	55,58	8,02	0,00	2,00	28,01	0,05

LTK – lignin topiv u kiselini; NLTK – lignin netopiv u kiselini

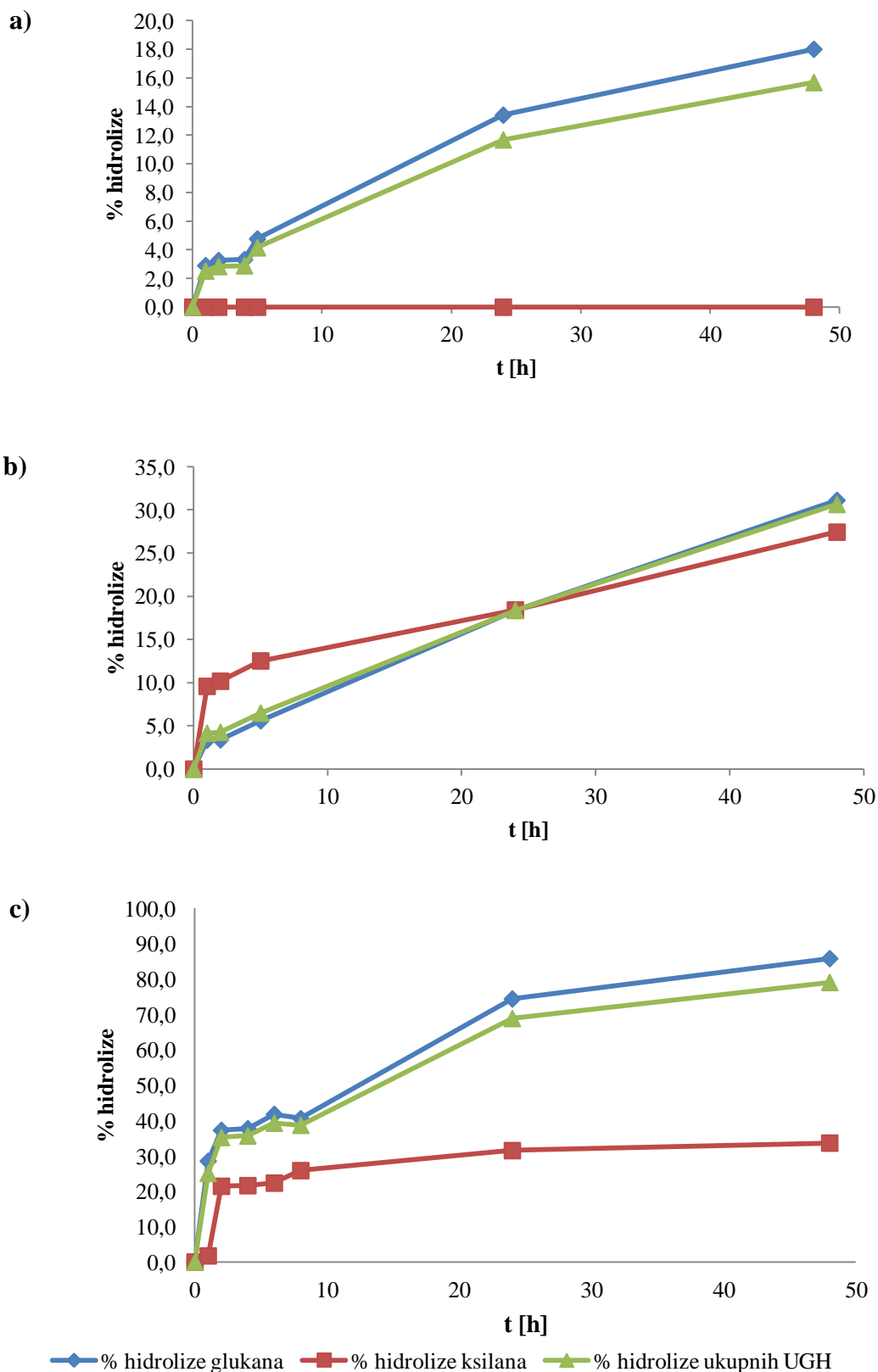
Nejestivi dijelovi kukuruza poput oklasaka i kukuruzovine imaju veliki potencijal kao sirovine za proizvodnju bioetanolu i ostalih biogoriva, posebice zbog toga što je kukuruz jedna od najviše uzgajanih poljoprivrednih kultura u svijetu. Najveći proizvođači kukuruza su SAD s oko 370 i Kina s oko 260 milijuna tona godišnje (Shahbandeh, 2019).

Provedenom analizom dobiveni su rezultati koji se mogu usporediti s rezultatima dobivenim u istraživanju Procantese i sur. (2015). Udio glukana (55,58 %), arabinana (0 %) i lignina topivog u kiselini (2 %) dobiven u ovom istraživanju odgovara podacima navedenima u radu Procantese i sur., gdje je udio glukana iznosio 52,7 %, arabinana 0 %, a lignina topivog u kiselini 2,3 %. Dobiveni udio lignina netopivog u kiselini (28,01 %) je viši od udjela dobivenog u navedenom istraživanju (10,3 %), dok je udio ksilana (8,02 %) niži od udjela ksilana (21,1 %) u opisanoj literaturi. Također, koncentracija furana (0,05 g L<sup>-1</sup>) je u korištenoj ispranoj, čvrstoj fazi nakon predobrade kukuruznih oklasaka manja od koncentracije navedene u literaturi (0,11 g L<sup>-1</sup>), što je povoljno za korištenje takve podloge u fermentacijama zbog smanjenog inhibitorskog djelovanja furana na mikroorganizam te posljedično i na efikasnost samog procesa.

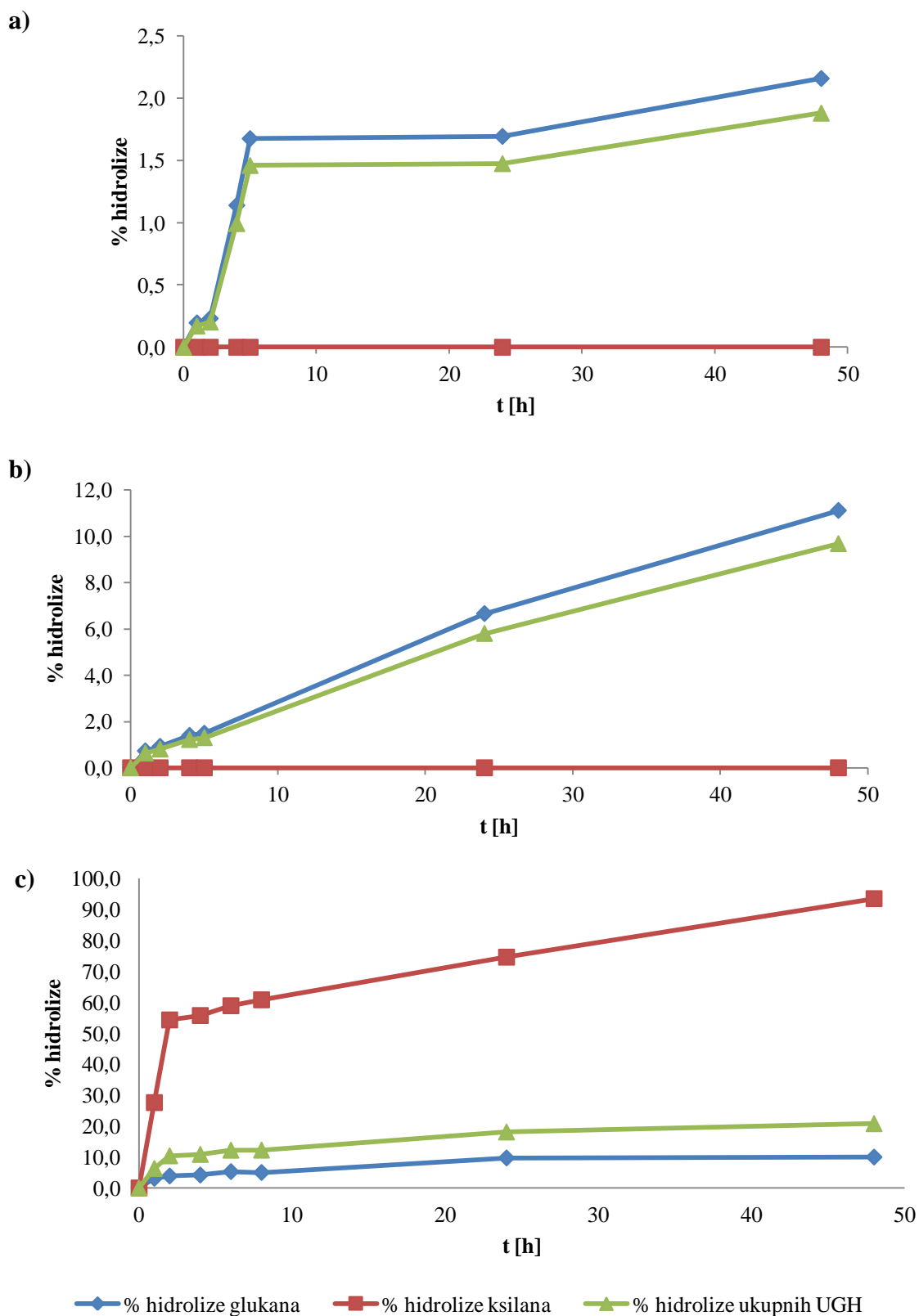


## 4.2. Enzimska hidroliza predobrađene sirovine

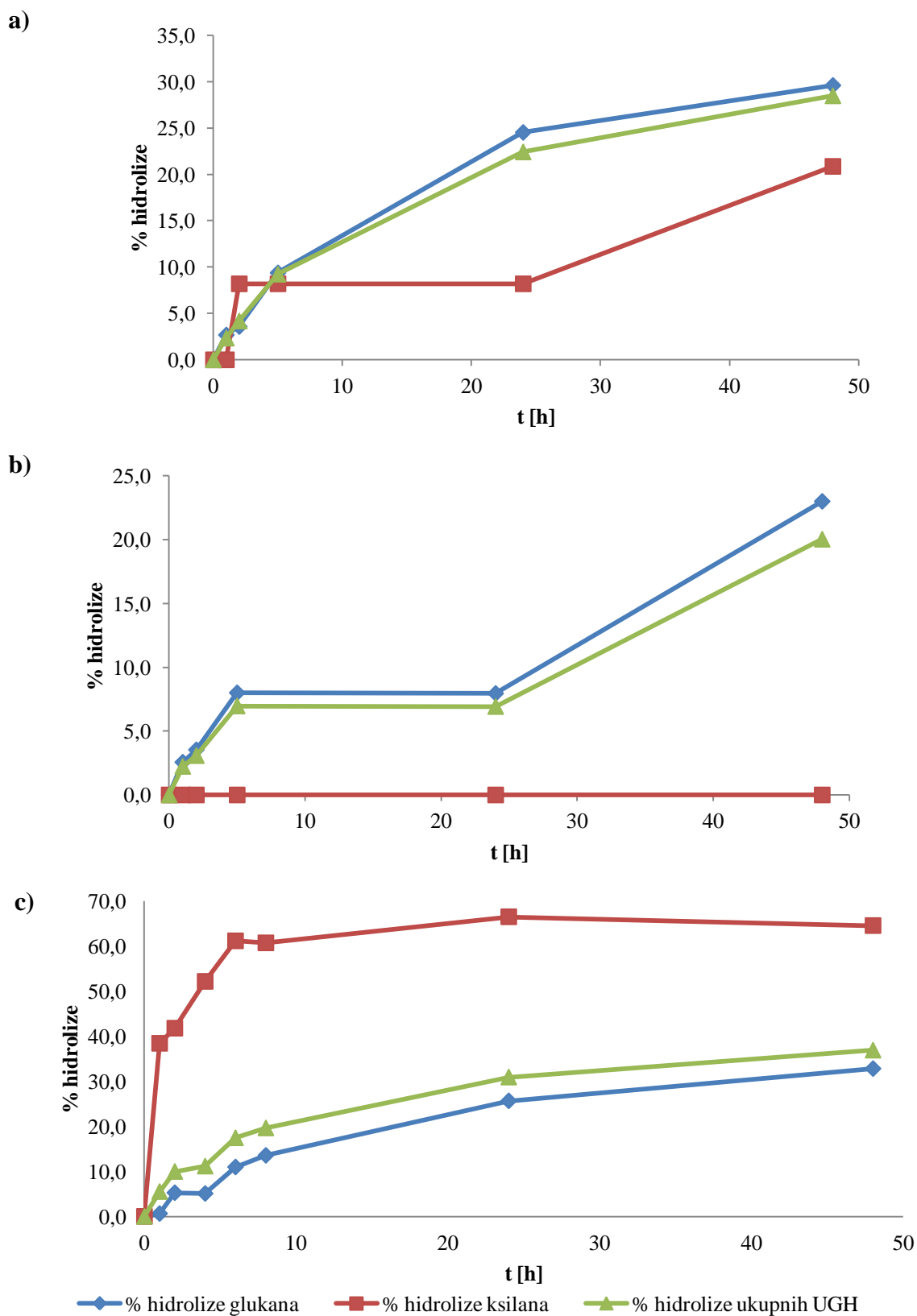
U ovom poglavlju prikazani su rezultati enzimske hidrolize samljevene i isprane čvrste faze zaostale nakon kiselinske predobrade kukuruznih oklasaka. Hidroliza je vođena kroz 48 sati na tri temperature od 20, 30 i 40 °C, u različitim medijima (acetatnom puferu i podlozi; Poglavlje 3.1.4., Materijali i metode) te uz dodatak različitih enzimskih pripravaka, Cellulase Blend-a i Viscozyme-a. Prema uputama proizvođača korištenih enzimskih pripravaka, enzimsku hidrolizu najbolje je provoditi u acetatnom puferu (Poglavlje 3.1.4.1., Materijali i metode). Međutim, budući da je svrha provedenog procesa enzimske hidrolize bila odrediti najbolji enzim za kasniji uzgoj radnog mikroorganizma u većem mjerilu, osim preporučenog pufera koristila se i podloga za uzgoj plijesni *M. indicus* (Poglavlje 3.1.4.2., Materijali i metode). Uzorci su analizirani analogno postupcima opisanim u Poglavljima 3.3.14. i 3.3.15. (Materijali i metode). Nakon provedene analize dobivene su koncentracije hidrolizirane glukoze i ksiloze. Određena je masa ukupnih ugljikohidrata nakon hidrolize koja predstavlja zbroj masa hidrolizirane glukoze i ksiloze. Dobiveni rezultati izraženi su kao stupnjevi hidrolize glukana i ksilana te stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata u odnosu na njihove udjele u početnoj sirovini, a prikazani su na Slikama 10. – 12. (enzimska hidroliza u acetatnom puferu) i 13. – 15. (enzimska hidroliza u podlozi).



**Slika 10.** Enzimaska hidroliza čvrstog dijela zaostalog nakon kiseline predobrade kukuruznih oklasaka provedena u acetatnom puferu uz 10 % (vol/vol) Cellulase Blend na temperaturi od: **a)** 20 °C; **b)** 30 °C; **c)** 40 °C



**Slika 11.** Enzimaska hidroliza čvrstog dijela zaostalog nakon kiseline predobrade kukuruznih oklasaka provedena u acetatnom puferu uz 10 % (vol/vol) Viscozyme na temperaturi od: **a)** 20 °C; **b)** 30 °C; **c)** 40 °C



**Slika 12.** Enzimaska hidroliza čvrstog dijela zaostalog nakon kiseline predobrade kukuruznih oklasaka provedena u acetatnom puferu uz 2 % (vol/vol) Cellulase Blend i 5 % (vol/vol) Viscozyme na temperaturi od: **a)** 20 °C; **b)** 30 °C; **c)** 40 °C

Na Slikama 10 – 12 prikazani su rezultati provedene enzimске hidrolize u acetatnom puferu pri temperaturama od 20, 30 i 40 °C. Slika 10. prikazuje rezultate dobivene korištenjem Cellulase Blend-a (10 % vol/vol). Slika 11. prikazuje rezultate procesa uz dodatak Viscozyme-a (10 % vol/vol), a Slika 12. prikazuje rezultate dobivene uz dodatak kombinacije navedenih enzima u koncentracijama 2 % (vol/vol) Cellulase Blend i 5 % (vol/vol) Viscozyme. Masa ukupnih ugljikohidrata nakon hidrolize predstavlja zbroj masa hidrolizirane glukoze i ksiloze. Dobiveni rezultati izraženi su kao stupnjevi hidrolize glukana i ksilana te stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata u odnosu na njihove udjele u početnoj sirovini.

Cellulase Blend (Slika 10.) pokazuje najveću aktivnost pri 40 °C (Slika 10.c) gdje je postignut maksimalni stupanj hidrolize glukana od 85,80 % i stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata od 79,09 %. Na 30 °C (Slika 10.b) stupanj hidrolize glukana iznosi 31,10 %, a na 20 °C (Slika 10.a) 18,01 % što je vidljivo najlošiji rezultat. Stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata također je najniži kod procesa vođenog na 20 °C, a iznosi 15,68 %. Na kraju procesa stupanj hidrolize ksilana pri 40 °C iznosi 33,64 %, pri 30 °C 27,42 %, a na 20 °C je hidroliza ksilana bila neuspješna (0 %). Međutim, ovaj enzimski pripravak ne sadrži značajne količine ksilanaza pa uz njegovu uporabu ne dolazi do efikasne hidrolize ksilana na sve tri ispitivane temperature.

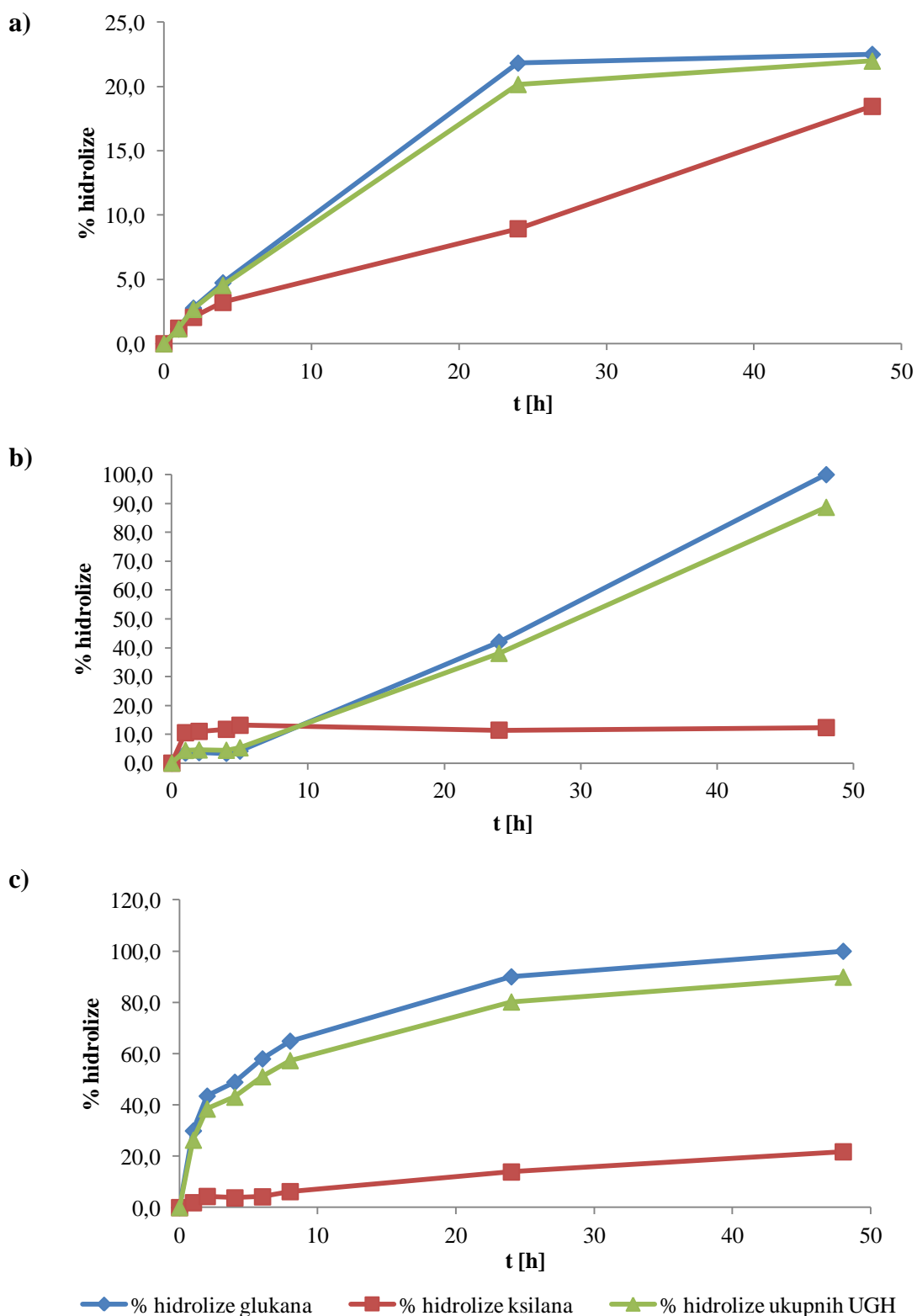
Dobivene vrijednosti mogu se usporediti s vrijednostima dobivenim u istraživanju Procantese i sur. (2015) koji su za enzimsku hidrolizu koristili enzimski pripravak Cellic Ctec 2 ( $T_{opt} = 45 - 50$  °C,  $pH_{opt} = 5,0$ ; Novozyme) u koncentraciji od 6 % (vol/vol) gdje se hidroliza provodila u sličnim uvjetima kao u ovom istraživanju (na tresilici uz  $180 \text{ min}^{-1}$ , pri 50 °C kroz 80 sati). Stupanj hidrolize glukana u opisanom istraživanju iznosio je 92 %, što je nešto više od stupnja hidrolize glukana pri 40 °C uz Cellulase Blend dobivenim u ovom istraživanju koji je iznosio 85,80 %. Ako se rezultati provedenog istraživanja usporede s istraživanjem Cutrim i sur. (2019) gdje je stupanj hidrolize glukana nakon 48 sati iznosio 35,92 % vidljivo je da je istraživanjem provedenim u ovom radu dobiven neznatno manji stupanj hidrolize glukana od 31,10 % pri 30 °C.

Dobiveni rezultati su u skladu s očekivanjima budući da je prema uputama proizvođača optimalna temperatura Cellulase Blend-a 50 °C, pa se na nižim temperaturama ne može očekivati visoka aktivnost.

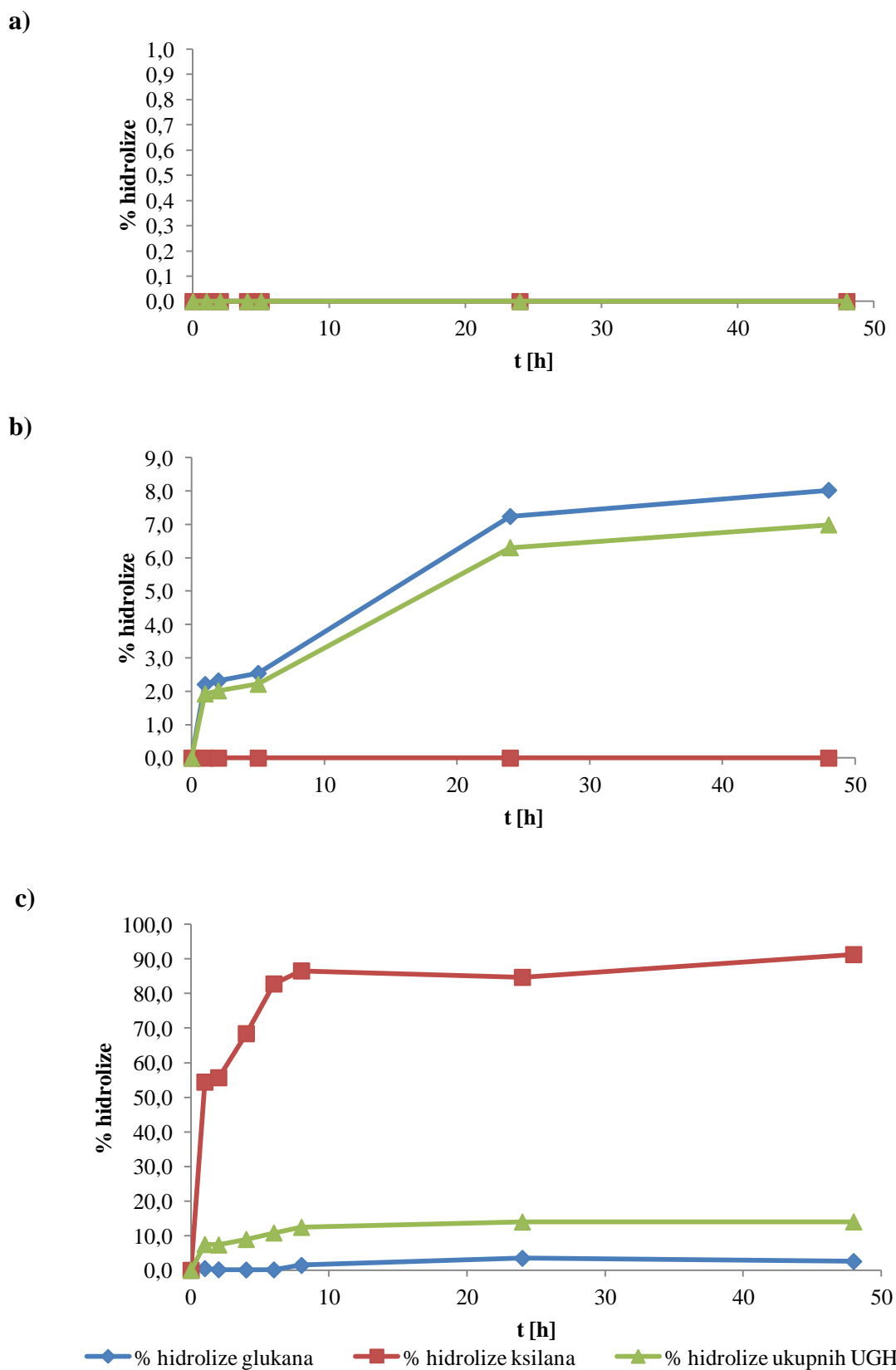
U procesu vođenom uz dodatak 10 % (vol/vol) Viscozyme-a (Slika 11.) najuspješnija je bila enzimaska hidroliza provedena pri temperaturi od 40 °C (Slika 11.c). Pri 40 °C dobiven je stupanj hidrolize ksilana od 93,51 %, dok je hidroliza ksilana na temperaturama od 20 (Slika 11.a) i 30 °C (Slika 11.b) bila neuspješna (0 %). Također, pri 40 °C dobiven je i najviši stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata koji je iznosio 20,76 %. Najviši stupanj hidrolize glukana ostvaren je pri 30 °C i iznosio je 11,11 %. Budući da se enzimski pripravak Viscozyme sastoji od smjese enzima u kojima prevladavaju ksilanaze, celulaze i  $\beta$ -glukozidaze čije su optimalne temperature iznad 50 °C, niskom iskorištenju hidrolize svih analiziranih ugljikohidrata uzrok mogu biti neadekvatni uvjeti za optimalan rad ovih enzima, što je u skladu s uputama proizvođača korištenih enzima.

Vrijednosti dobivene nakon enzimске hidrolize provedene uz dodatak Cellulase Blend-a (2 % vol/vol) i Viscozyme-a (5 % vol/vol) prikazani su na Slici 12. Pri 20 °C (Slika 12.a) stupanj hidrolize glukana iznosi 29,62 %, dok je stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata 28,49 %. Na 30 °C (Slika 12.b) je iskorištenje hidrolize nešto veće, odnosno iznosi 37,88 % za glukane te 32,89 % za ukupne ugljikohidrate. Kod procesa vođenog na temperaturi od 40 °C (Slika 12.c), stupanj hidrolize glukana (32,81 %) je niži od onog na 30 °C, a stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata je očekivano viši (36,91 %). Stupanj hidrolize ksilana je na temperaturi od 30 °C jednak nuli, dok je na 20 i 40 °C hidroliza bila uspješnija te stupanj hidrolize iznosi 20,88 % odnosno 64,57 %.

Acetatni pufer u ovim eksperimentima koristio se kao referentna otopina za određivanje aktivnosti korištenih enzimskih pripravaka (Cellulase Blend i Viscozyme) prema uputama proizvođača. Najveća uspješnost hidrolize predtretiranih kukuruznih oklasaka u acetatnom puferu određena je uz dodatak 10 % (vol/vol) suspenzije Cellulase Blend pri 40 °C pri čemu je postignut stupanj hidrolize glukana od 85,80 %, ukupnih ugljikohidrata od 79,09 % te stupanj hidrolize ksilana od 33,64 %. Razlog nepotpune hidrolize početne sirovine prema istraživanju Xiao i sur. (2004) može biti inhibicija enzima produktima enzimске hidrolize. Nakon uklanjanja dobivenih produkata u istraživanju Xiao i sur. (2004), početna sirovina je hidrolizirana u potpunosti. Budući da enzimi korišteni u sklopu ovog istraživanja također ne hidroliziraju početnu sirovinu u potpunosti, može se pretpostaviti da su enzimi tijekom ovog procesa inhibirani krajnjim produktima te da zbog toga ne provode potpunu hidrolizu predobrađenih kukuruznih oklasaka do monomernih jedinica.

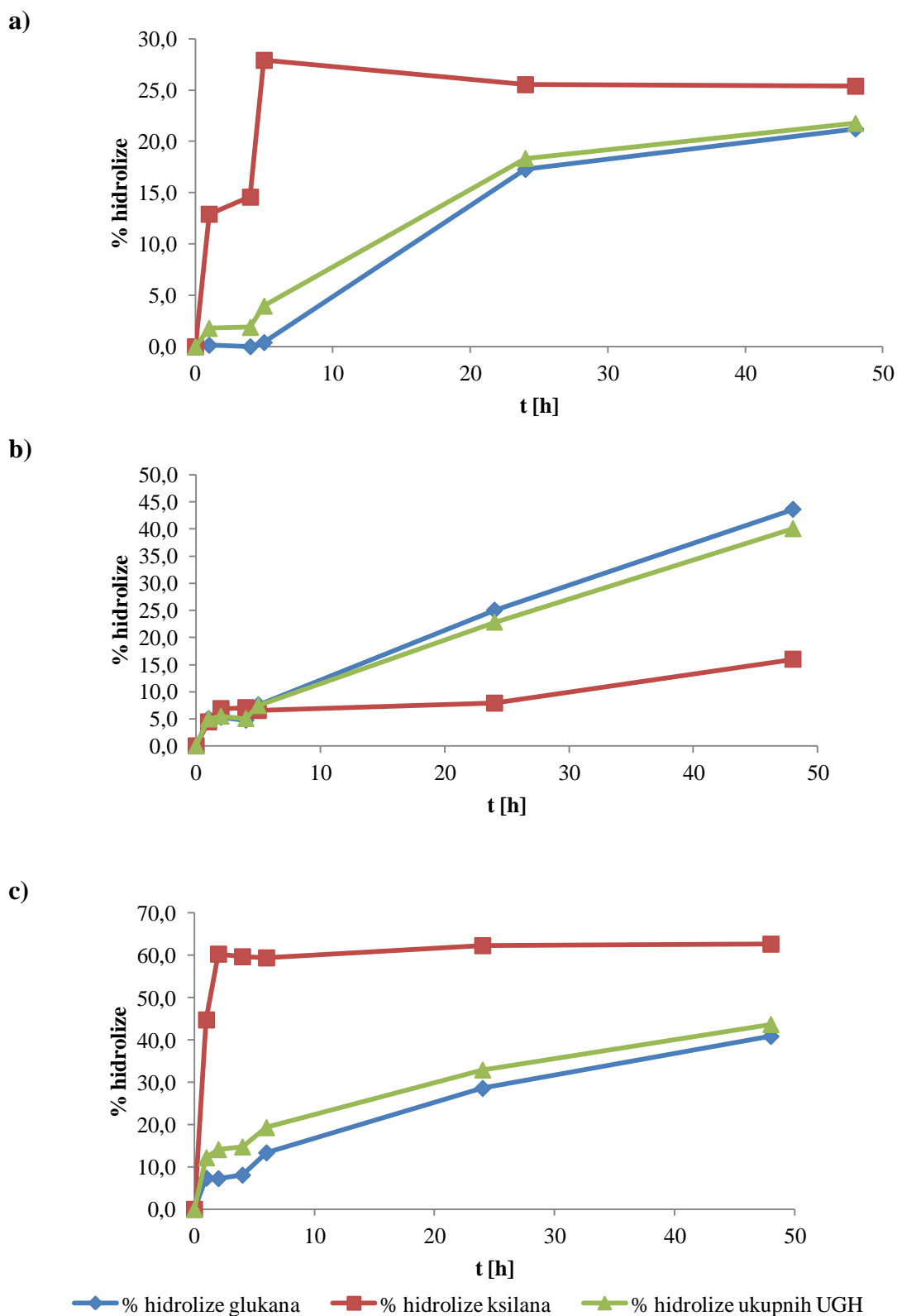


**Slika 13.** Enzimaska hidroliza čvrstog dijela zaostalog nakon kiselinske predobrade kukuruznih oklasaka provedena u podlozi uz 10 % (vol/vol) Cellulase Blend na temperaturi od: **a)** 20 °C; **b)** 30 °C; **c)** 40 °C



**Slika 14.** Enzimaska hidroliza čvrstog dijela zaostalog nakon kiselinske predobrade kukuruznih oklasaka provedena u podlozi uz 10 % (vol/vol) Viscozyme na temperaturi od: **a)** 20 °C; **b)** 30 °C; **c)** 40 °C





**Slika 15.** Enzimaska hidroliza čvrstog dijela zaostalog nakon kiseline predobrade kukuruznih oklasaka provedena u podlozi uz 2 % (vol/vol) Cellulase Blend i 5 % (vol/vol) Viscozyme na temperaturi od: **a)** 20 °C; **b)** 30 °C; **c)** 40 °C

Na Slikama 13. – 15. prikazani su rezultati enzimske hidrolize provedene u podlozi kakva će se koristiti u uzgoju plijesni *M. indicus* postupkom simultane saharifikacije i fermentacije. Enzimska hidroliza provodila se u navedenoj podlozi kako bi se uvidjelo koliko njezin sastav utječe na efikasnost enzima. Sastav podloge opisan je u Poglavlju 3.1.4.1. (Materijali i metode). Uvjeti odvijanja procesa opisani su u uvodnom dijelu ovog poglavlja.

Na Slici 13. prikazani su rezultati dobiveni analizom uzoraka nakon enzimske hidrolize u podlozi uz 10 % (vol/vol) Cellulase Blend. Najmanje vrijednosti iskorištenja hidrolize sve tri promatrane komponente dobivene su na temperaturi od 20 °C (Slika 13.a). Stupanj hidrolize glukana iznosio je 22,51 %, stupanj hidrolize ksilana 18,46 %, a stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata 21,98 %. Na 30 °C (Slika 13.b) rezultati su značajno viši za glukana (100 %) i ukupne ugljikohidrate (88,68 %), dok je stupanj hidrolize ksilana nešto niži (12,33 %) nego kod procesa vođenog na 20 °C. Proces vođen pri temperaturi od 40 °C (Slika 13.c) pokazuje najveću uspješnost hidrolize. Stupanj hidrolize glukana iznosio je 100 %, stupanj hidrolize ksilana 21,77 %, a stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata 89,90 %. Razlog visokog stupnja hidrolize je sama temperatura enzimske hidrolize (40 °C) koja je bliska optimalnim temperaturama enzima sadržanih u enzimskom pripravku određenih od strane proizvođača.

Slika 14. prikazuje rezultate dobivene u procesu provedenom uz dodatak enzimskog pripravka Viscozyme u koncentraciji od 10 % (vol/vol). Na temperaturi od 20 °C (Slika 14.a) stupanj hidrolize sve tri analizirane komponente bio je nezadovoljavajući (0 %). Pri temperaturi od 30 °C (Slika 14.b) su također dobivena niska iskorištenja hidrolize. Stupanj hidrolize glukana iznosio je 8,03 %, ksilana 0 %, a ukupnih ugljikohidrata 6,99 %. Niska uspješnost hidrolize glukana i ukupnih ugljikohidrata ostvarena je i na temperaturi od 40 °C (Slika 14.c), gdje je stupanj hidrolize glukana iznosio 2,54 %, a stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata 13,99 %. Međutim, pri 40 °C stupanj hidrolize ksilana iznosio je 91,31 %. Ovakav se rezultat može objasniti time da Viscozyme sadrži ksilanaze kojima pogoduje povišenje temperature u odnosu na prethodne procese (na 20 i 30 °C). Zbog povišenja temperature, njihova je aktivnost veća te provode efikasnu hidrolizu ksilana.

Kombinacijom 2 % (vol/vol) Cellulase Blend-a i 5 % (vol/vol) Viscozyme-a dobiveni su rezultati prikazani na Slici 15. Na 20 °C (Slika 15.a) stupanj hidrolize glukana iznosi 21,23 %, ksilana 25,39 %, a stupanj iskorištenja ukupnih ugljikohidrata 21,76 %. Viša iskorištenja hidrolize glukana i ukupnih ugljikohidrata dobivena su u procesima vođenim na 30 °C

prikazanim na Slici 15.b. (43,6 % glukana i 40,03 % ukupni ugljikohidrati) i 40 °C prikazanim na Slici 15.c. (40,86 % glukana i 43,67 % ukupni ugljikohidrati). Međutim, stupanj hidrolize ksilana se razlikuje između ove dvije temperature, točnije na 30 °C on iznosi 15,97 %, a na 40 °C 62,68 %. Ivančić Šantek i sur. (2018) su nakon 48 sati hidrolize kukuruznih oklasaka na temperaturi od 50 °C uz Celluclast 1.5L i Viscozyme L ostvarili iskorištenje glukana od 52,69 % i ksilana 62,84 %, što je nešto više u odnosu na rezultate dobivene analizom uzoraka enzimske hidrolize vođene na 40 °C. Usporedbom rezultata dobivenih u istraživanju Ivančić Šantek i sur. s rezultatima dobivenim u provedenom procesu može se zaključiti da bi daljnje povećanje temperature procesa enzimske hidrolize utjecalo na bolje iskorištenje samog procesa.

Usporedbom provedenih enzimskih hidroliza u puferu i u podlozi uočava se da je temperatura od 20 °C preniska za provođenje efikasne enzimske hidrolize. Najviši stupanj hidrolize pri 20 °C postigao se u podlozi uz kombinaciju enzima gdje je nakon 48 sati vođenja procesa stupanj hidrolize ksilana iznosio 25,39 %, što nije zadovoljavajući rezultat za prijenos u veće mjerilo. Na temperaturi od 30 °C postignuti su vrlo dobri rezultati, posebice u podlozi uz Cellulase Blend, gdje je stupanj hidrolize glukana iznosio 100 %, za razliku od pufera gdje je iznosio 31,10 %. Niski stupanj hidrolize ksilana na 30 °C kod sve tri varijante dodanih enzima može biti posljedica razgranate strukture samog ksilana i prisutnosti različitih bočnih ogranaka i grupa zbog čega je djelovanje enzima otežano (Van Eysen i sur., 2011). Kod procesa vođenih na temperaturi od 40 °C dobiveni rezultati za Cellulase Blend i u podlozi i u puferu odgovaraju očekivanjima. Naime, prema uputama proizvođača, optimalne temperature za aktivnost enzima sadržanih u korištenom enzimskom pripravku su u rasponu od 50 – 80 °C.

Usporedbom Viscozyme-a i Cellulase Blend-a može se zaključiti kako je unatoč nižem stupnju hidrolize ksilana, Cellulase Blend u koncentraciji od 10 % (vol/vol) pri temperaturama od 30 i 40 °C bolji za proces enzimske hidrolize čvrste faze zaostale nakon kiselinske predobrade kukuruznih oklasaka. Prednost Cellulase Blend-a za upotrebu u većem mjerilu potvrđuje i usporedba uspješnosti enzimske hidrolize u podlozi i u puferu. Viša iskorištenja hidrolize dobivena su u podlozi, što se postavlja kao prednost u odnosu na pufer, budući da je korištena podloga na kojoj će se provoditi proces simultane enzimske hidrolize i fermentacije.

Na temelju analiziranih podataka, za proces uzgoja plijesni *Mucor indicus* u Erlenmayer tikvicama postupkom simultane saharifikacije i fermentacije odabran je enzimski pripravak Cellulase Blend te su procesi vođeni na 30 i 40 °C.

### **4.3. Uzgoj plijesni *M. indicus* i proizvodnja bioetanola na predobrađanim kukuruznim oklascima u Erlenmayer tikvicama**

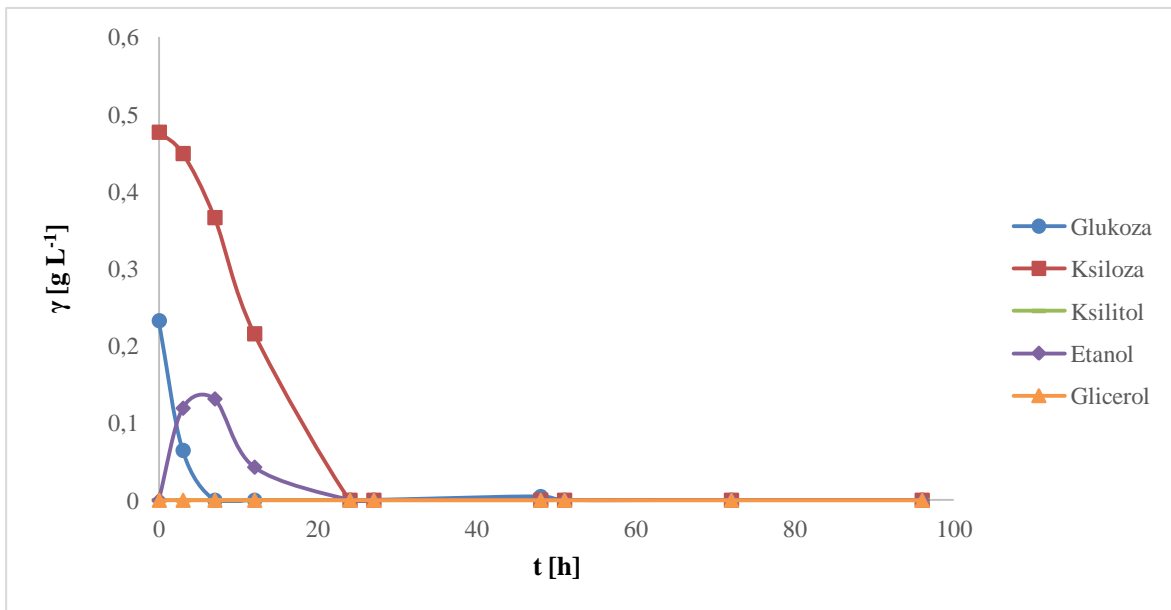
Uzgoj plijesni *Mucor indicus* proveden je na tresilici u tri Erlenmayer tikvice volumena 500 mL koje su sadržavale podloge pripremljene na način opisan u Poglavlju 3.1.6.3. (Materijali i metode). Podloga s acetatnim puferom korištena je kako bi se ispitalo može li *M. indicus* rasti u uvjetima optimalnim za enzime sadržane u korištenom Cellulase Blend-u (optimalni uvjeti definirani od strane proizvođača enzima) koji je dodan u tikvice u koncentraciji od 4 % (vol/vol). Uzgojima u Erlenmayer tikvicama volumena 500 mL istraživali su se optimalni uvjeti za potencijalno uvećanje mjerila odnosno uzgoj *M. indicus* u bioreктору s miješalom. Rezultati su prikazani u Poglavljima 4.3.1. i 4.3.2.

#### **4.3.1. Uzgoj plijesni *M. indicus* u acetatnom puferu i podlozi na temperaturi od 30 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend**

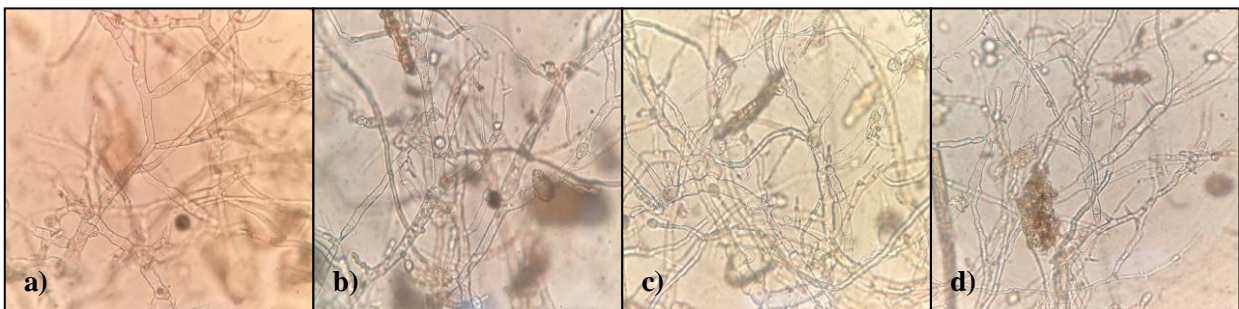
U ovom Poglavlju opisan je uzgoj radnog mikroorganizma na čvrstom dijelu zaostalom nakon kiselinske predobrade kukuruznih oklasaka u aerobnim uvjetima u puferu i podlozi, čiji je sastav opisan u Poglavlju 3.1.6.2.1. (Materijali i metode). Temperatura uzgoja održavana je na 30 °C, broj okretaja tresilice na 180 o min<sup>-1</sup>, a proces je trajao 96 sati. Uzorci su uzimani u redovnim razmacima te su obrađeni i pripremljeni za UPLC analizu (Poglavlje 3.3.15., Materijali i metode). Analizom su dobivene koncentracije hidrolizirane glukoze i ksiloze te produkata fermentacije, etanola, ksilitola i glicerola. Rezultati su prikazani na Slikama 16, 18 i 20. Slika 16. prikazuje uzgoj u podlozi bez dodatka Cellulase Blenda, Slika 18. prikazuje uzgoj u podlozi uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blenda dok Slika 20. prikazuje uzgoj u puferu također uz dodatak Cellulase Blenda u koncentraciji od 4 % (vol/vol). Kroz proces je također praćen rast samog mikroorganizma mikrobiološkim metodama, što je prikazano na Slikama 17, 19 i 21.

#### 4.3.1.1. Uzgoj plijesni *M. indicus* u podlozi na 30 °C bez dodatka enzima

*Mucor indicus* ima sposobnost sinteze ekstracelularnih enzima poput fitaza, amilaza, ksilanaza i celulaza, koji efikasno hidroliziraju lignocelulozne sirovine (Gulati i sur., 2007). Provedbom procesa uzgoja u podlozi bez dodatka enzima ispitana je mogućnost sinteze navedenih ekstracelularnih enzima u datim uvjetima. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 16. Rast plijesni tijekom odvijanja procesa prikazan je na Slici 17.



**Slika 16.** Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, ksilitola, etanola i glicerola tijekom uzgoja u podlozi na 30 °C bez dodatka Cellulase Blend-a

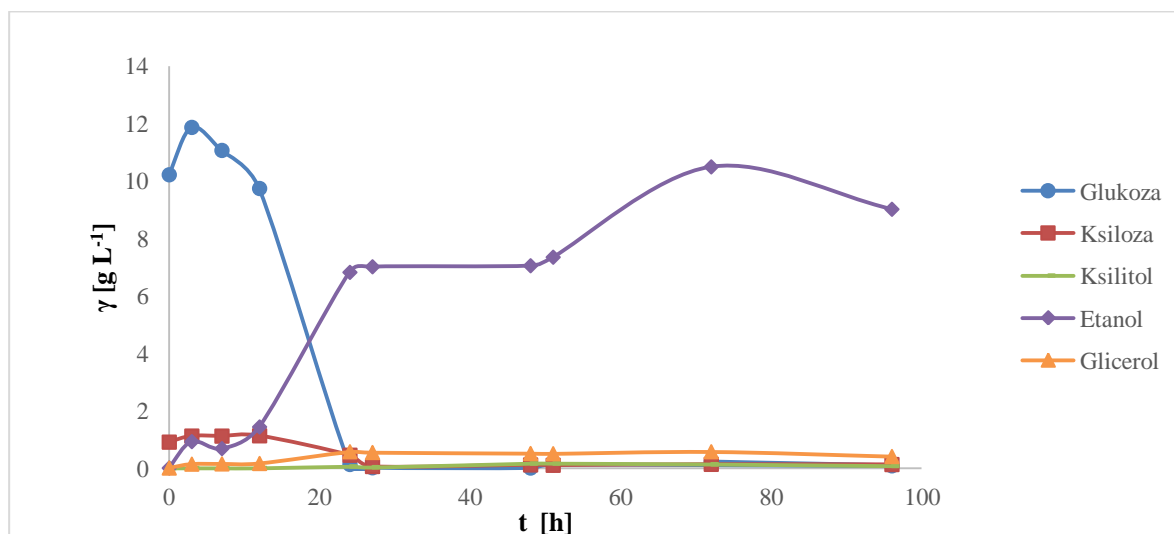


**Slika 17.** Rast plijesni *M. indicus* u podlozi na 30 °C bez dodatka enzima tijekom 96 sati uzgoja: a) 24 h; b) 48 h; c) 72 h; d) 96 h

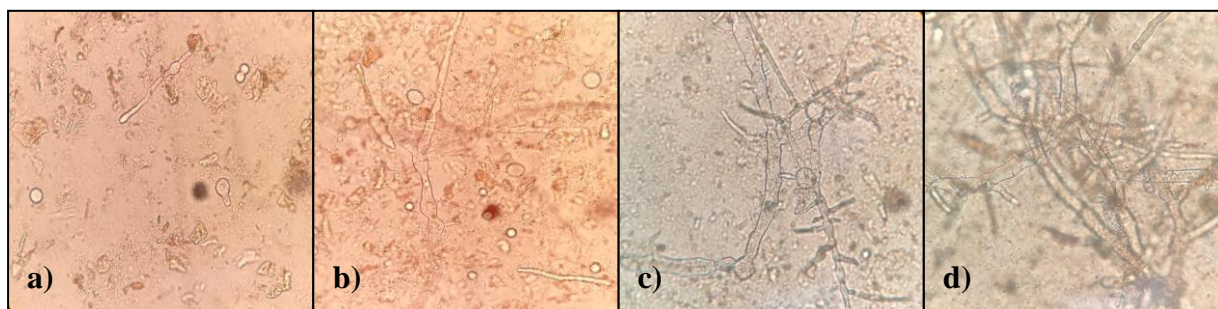
Uzgoj proveden u podlozi bez dodatka enzimskog pripravka Cellulase Blend-a prikazan na Slici 16. pokazao se kao najlošiji u smislu proizvodnje etanola u odnosu na procese koji su se provodili uz dodatak Cellulase Blend-a. U nedostatku dodanih enzima ne dolazi do efikasne hidrolize čvrstog dijela kiselinski predobrađenih kukuruznih oklasaka te su koncentracije šećera puno niže u usporedbi s drugim provedenim procesima. U početku u podlozi prevladava ksiloza ( $0,47 \text{ g L}^{-1}$ ) te nešto manje glukoze ( $0,23 \text{ g L}^{-1}$ ). Glukoza se u potpunosti utroši do sedmog sata uzgoja, kad se dostiže maksimalna koncentracija etanola ( $0,13 \text{ g L}^{-1}$ ). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da iako *M. indicus* ima sposobnost sinteze ekstracelularnih enzima koji razgrađuju lignocelulozne supstrate, produktivnost procesa proizvodnje etanola vođenih bez dodatka određenih enzimskih pripravaka je vrlo niska. Nakon 7 h uzgoja, produktivnost iznosi  $0,0188 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . *M. indicus* proizvodi etanol u aerobnim uvjetima, a u nedostatku pentoza i heksoza koristi ga kao glavni izvor ugljika za svoj rast (Karimi i sur., 2006) što je i vidljivo iz rezultata prikazanih na Slici 17. Nakon sedmog sata uzgoja koncentracija etanola počinje padati te usporedno s njegovim padom biomasa plijesni raste.

#### 4.3.1.2. Uzgoj plijesni *M. indicus* u podlozi pri $30 \text{ }^\circ\text{C}$ uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a

Budući da je enzimaska hidroliza u podlozi pri  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  uz dodatak 10 % (vol/vol) koncentracije enzimskog pripravka Cellulase Blend bila uspješna (Poglavlje 4.2., Slika 13.), proveden je uzgoj *M. indicus* u istom mediju te pri istim uvjetima uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a. Rezultati su prikazani na Slikama 18. i 19.



**Slika 18.** Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, ksilitola, etanola i glicerola tijekom uzgoja u podlozi na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a



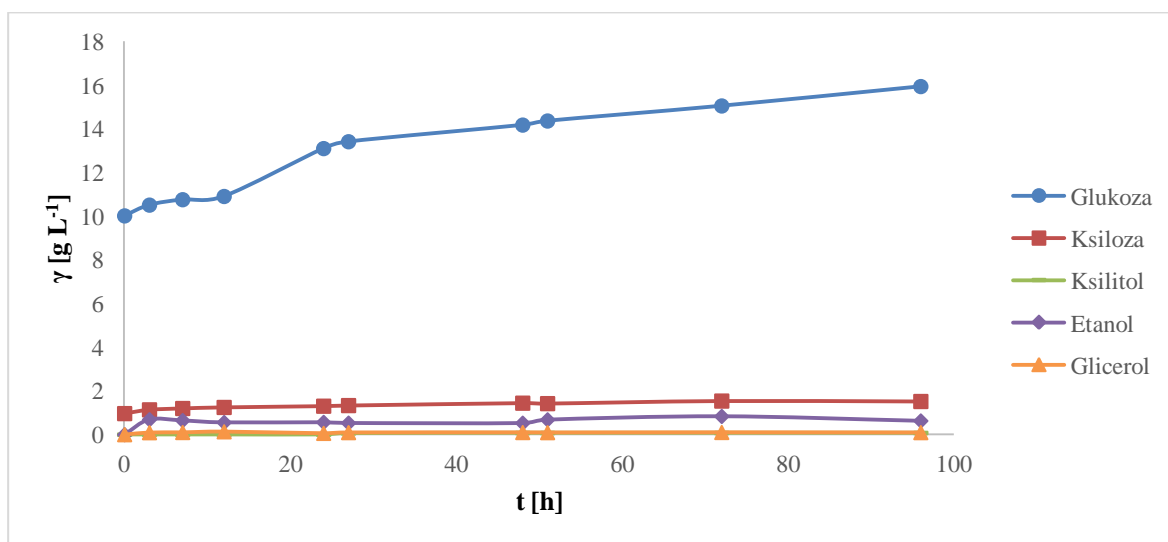
**Slika 19.** Rast plijesni *M. indicus* u podlozi na 30 °C uz 4 % (vol/vol) Cellulase Blend tijekom 96 sati uzgoja: **a)** 24 h; **b)** 48 h; **c)** 72 h; **d)** 96 h

Iz Slike 18. vidljivo je da se glukoza tijekom odvijanja procesa uspješno troši za proizvodnju etanola te za rast biomase koji je prikazan na Slici 19. Početna koncentracija glukoze iznosila je  $10,21 \text{ g L}^{-1}$ . Do trećeg sata uzgoja koncentracija glukoze raste do  $11,86 \text{ g L}^{-1}$  što je znak da se odvija enzimska hidroliza te da je mikroorganizmu potrebno određeno vrijeme adaptacije kako bi započeo proizvodnju etanola. Nakon maksimuma u trećem satu, koncentracija glukoze konstantno pada do  $0,22 \text{ g L}^{-1}$  na kraju uzgoja nakon 96 sati. Sličan trend može se zapaziti kod promjene koncentracije ksiloze, čija koncentracija u nultom satu iznosi  $0,90 \text{ g L}^{-1}$ , maksimum dostiže u 12-om satu nakon čega kontinuirano pada do 96-tog sata odnosno kraja procesa. Nasuprot tome, koncentracija etanola kroz cijelo vrijeme vođenja procesa raste. U 72 satu dostiže svoj maksimum ( $10,49 \text{ g L}^{-1}$ ) nakon čega blago pada do  $9,01 \text{ g L}^{-1}$ . Produktivnost procesa proizvodnje etanola nakon 72 sata uzgoja iznosila je  $0,1457 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Koncentracije ksilitola i glicerola su također u vidnom porastu. Ksilitol s početnih  $0 \text{ g L}^{-1}$  na kraju uzgoja dostiže koncentraciju od  $0,07 \text{ g L}^{-1}$ , dok glicerol maksimalnu koncentraciju ( $0,57 \text{ g L}^{-1}$ ) dostiže nakon 24 h uzgoja. Na Slici 19. prikazan je djelomično filamentozni rast plijesni kroz 96 sati uzgoja.

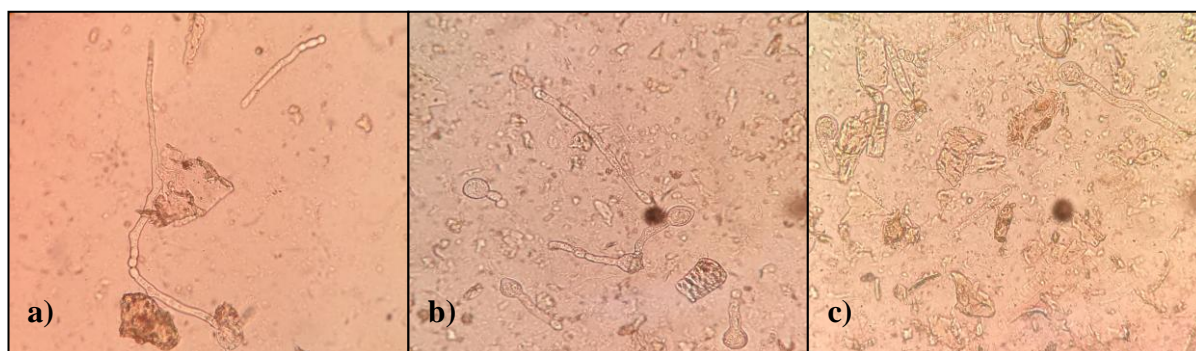
Usporedbom dobivenih rezultata uzgoja s rezultatima dobivenima u istraživanju Abedinifar i sur. (2009) koji su provodili uzgoj na hidrolizatima rižine slame, vidi se da u oba slučaja *M. indicus* u potpunosti asimilira glukožu tijekom prvih 25 sati. Što se tiče proizvodnje etanola tijekom istraživanja provedenog u ovom radu, maksimalna koncentracija iznosila je  $10,49 \text{ g L}^{-1}$ , dok je u navedenom istraživanju dobivena viša koncentracija koja je iznosila  $17,5 \text{ g L}^{-1}$ . Osim nešto višeg prinosa etanola što je moguća posljedica korištenja različitog supstrata i njegove predobrade, njihovi rezultati slažu se s rezultatima prikazanim na Slici 18.

#### 4.3.1.3. Uzgoj plijesni *M. indicus* u acetatnom puferu na 30 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a

Hidrolizom lignoceluloznih materijala moguće je dobiti visoke koncentracije heksoza i pentoza koje mikroorganizmi mogu fermentirati do bioetanola i ostalih proizvoda. Međutim, prilikom hidrolize takvih materijala, osim heksoza i pentoza, oslobađaju se i druge komponente koje mogu imati antimikrobno djelovanje poput furana, fenola i karboksilnih kiselina (Lennartsson i sur., 2009). Budući da je prema uputama proizvođača korištenog enzimskog pripravka Cellulase Blend-a optimalni medij za efikasnu enzimsku hidrolizu acetatni pufer, u ovom je dijelu istraživanja provedeno ispitivanje uspješnosti rasta plijesni *M. indicus* te produktivnosti procesa proizvodnje etanola u mediju koji sadrži acetatni pufer. Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 20. i 21.



**Slika 20.** Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, ksilitola, etanola i glicerola tijekom uzgoja u puferu na 30 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a



**Slika 21.** Rast plijesni *M. indicus* u acetatnom puferu na 30 °C uz Cellulase Blend tijekom 48 sati uzgoja: **a)** 3 h; **b)** 24 h; **c)** 48 h



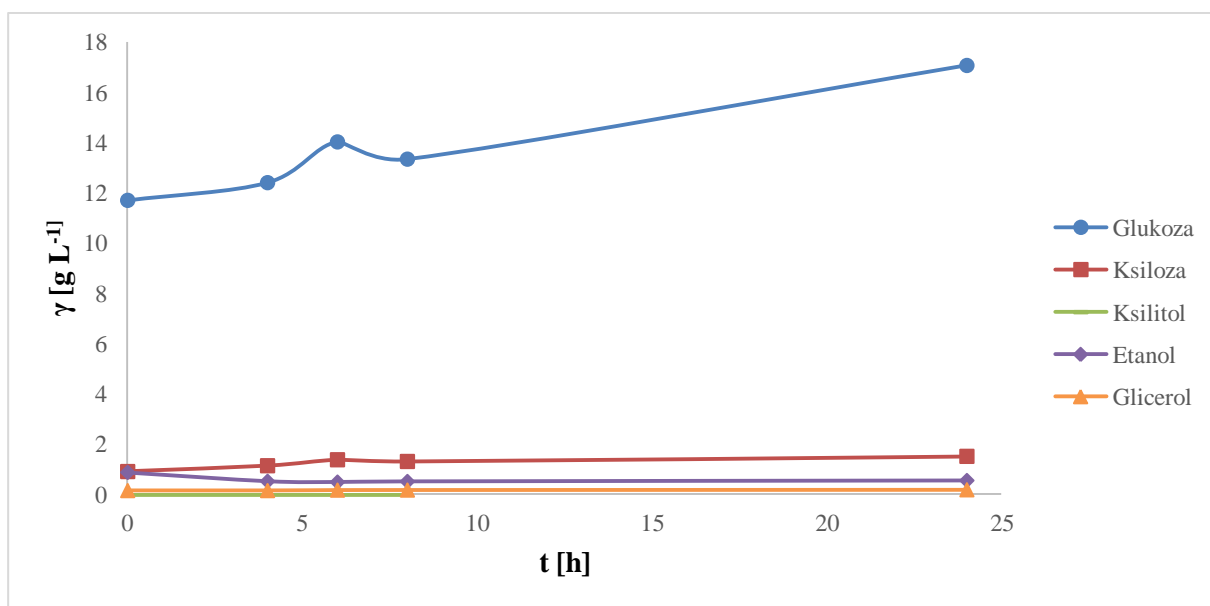
Na Slici 20. vidljiva je promjena koncentracije glukoze tijekom procesa s početnih  $10,02 \text{ g L}^{-1}$  u nultom do  $15,95 \text{ g L}^{-1}$  u 96-om satu uzgoja. Koncentracija ksiloze je u blagom porastu kroz vrijeme odvijanja uzgoja, s početnih  $0,96 \text{ g L}^{-1}$  do konačnih  $1,52 \text{ g L}^{-1}$ . Tijekom prva tri sata plijesan previre glukozu i ksilozu do etanola, pri čemu je u trećem satu izmjerena koncentracija etanola od  $0,68 \text{ g L}^{-1}$  nakon čega raste do maksimalne vrijednosti od  $0,83 \text{ g L}^{-1}$  u 72-om satu. Koncentracije ksilitola i glicerola se tijekom ovog procesa neznatno povećavaju. Što se tiče rasta biomase prikazanog na Slici 21., vidljivo je da mikroorganizam raste u filamentoznom obliku te da nakon 24 sata procesa rast prestaje. Ovakvi rezultati u skladu su s porastom koncentracije glukoze i blagim rastom koncentracije etanola. Iz dobivenih rezultata vidi se da je enzimaska hidroliza supstrata puno brža od potrošnje produkata same hidrolize. Izračunata produktivnost procesa proizvodnje etanola nakon 72 sata uzgoja iznosi  $0,0116 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  i značajno je niža od produktivnosti procesa vođenih u podlozi koji su opisani u Poglavljima 4.3.1.1. i 4.3.1.2. Ovaj rezultat potvrđuje pretpostavku iz uvodnog dijela ovog Poglavlja da octena kiselina prisutna u mediju djeluje inhibirajuće na rast plijesni *Mucor indicus*.

#### **4.3.2. Uzgoj plijesni *M. indicus* u acetatnom puferu i podlozi na temperaturi od 40 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend**

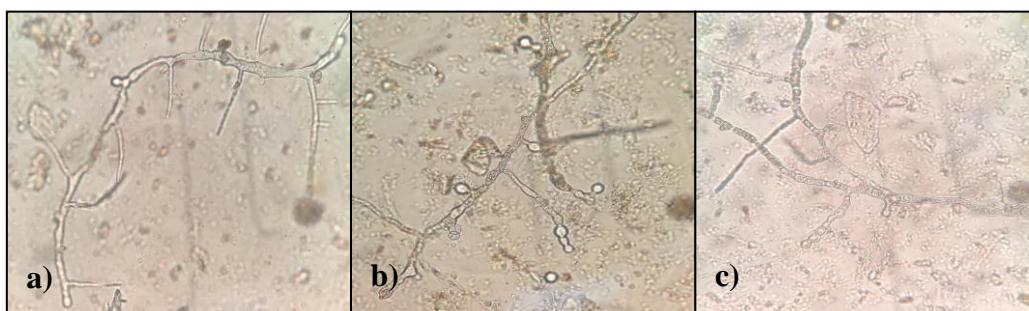
Ovo poglavlje prikazuje rezultate dobivene uzgojem radnog mikroorganizma na čvrstom dijelu zaostalom nakon kiselinske predobrade kukuruznih oklasaka u aerobnim uvjetima u acetatnom puferu i podlozi čiji je sastav opisan u Poglavlju 3.1.6.2.1. (Materijali i metode), pri temperaturi od 40 °C. Svakoj je tikvici dodan enzimski pripravak Cellulase Blend u koncentraciji od 4 % (vol/vol). Proces je trajao 24 sata pri čemu je broj okretaja tresilice održavan na  $180 \text{ o min}^{-1}$ . Uzorci su uzimani u redovnim razmacima te su obrađeni i pripremljeni za UPLC analizu (Poglavlje 3.3.15., Materijali i metode). Analizom su dobivene koncentracije hidrolizirane glukoze i ksiloze te produkata fermentacije, etanola, ksilitola i glicerola. Rezultati su prikazani na Slikama 22. i 24. Slika 22. prikazuje uzgoj u podlozi uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend dok Slika 24. prikazuje uzgoj u puferu također uz dodatak Cellulase Blend u koncentraciji od 4 % (vol/vol). Kroz proces je također praćen rast samog mikroorganizma mikrobiološkim metodama, što je prikazano na Slikama 23. i 25. Dobiveni rezultati prikazani su u nastavku.

#### 4.3.2.1. Uzgoj plijesni *M. indicus* u podlozi na 40 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a

Iz rezultata prikazanih u Poglavlju 4.2. (Slika 13.) vidi se da Cellulase Blend u podlozi pokazuje najveću aktivnost pri 40 °C (Slika 13.c). Pri toj temperaturi postignuta su najviša iskorištenja hidrolize glukana (100 %) i ukupnih ugljikohidrata (89,90 %), a stupanj hidrolize ksilana iznosio je 21,77 %. Stoga je u ovom dijelu istraživanja ispitano može li *M. indicus* rasti i proizvoditi etanol, glicerol i ksilitol u uvjetima najprikladnijima za uspješnu enzimsku hidrolizu. Rezultati su prikazani na Slikama 22. i 23.



**Slika 22.** Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, ksilitola, etanola i glicerola tijekom uzgoja u podlozi na 40 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a



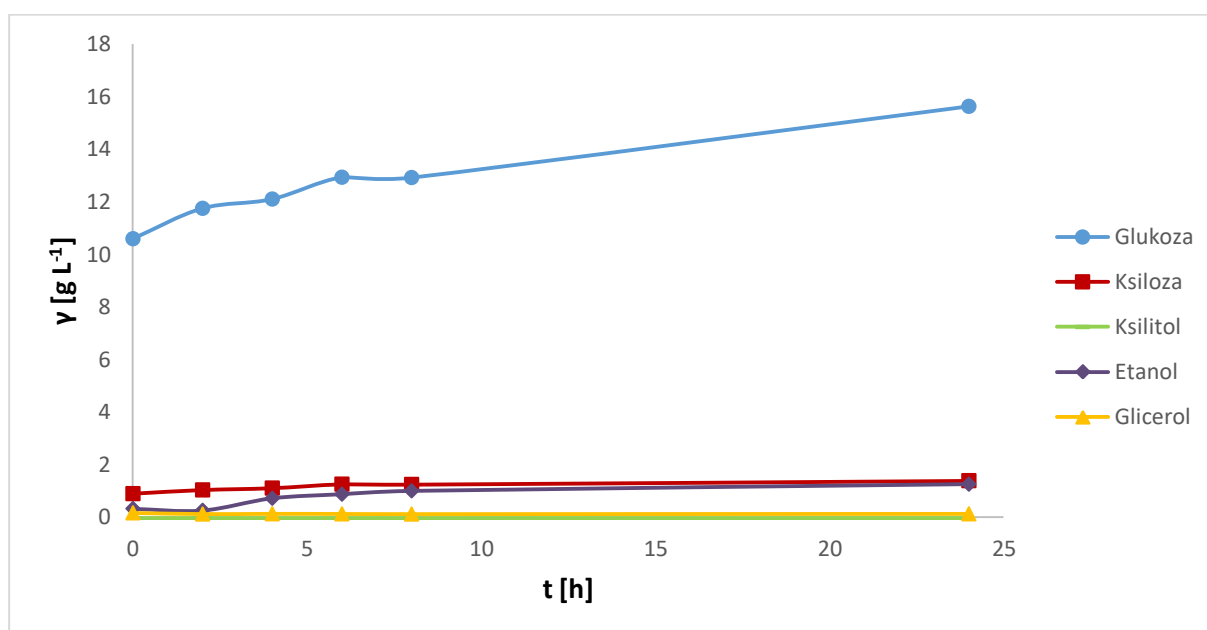
**Slika 23.** Rast plijesni *M. indicus* u podlozi na 40 °C uz 4 % (vol/vol) Cellulase Blend tijekom 24 sata uzgoja: **a)** 0 h; **b)** 8 h; **c)** 24 h

Na Slici 22. vidljivo je da je enzimaska hidroliza uspješna, budući da enzimima sadržanima u enzimskom pripravku Cellulase Blend odgovara temperatura od 40 °C. Početna izmjerena koncentracija glukoze iznosila je 11,7 g L<sup>-1</sup>, a konačna 17,08 g L<sup>-1</sup>. Međutim, ta

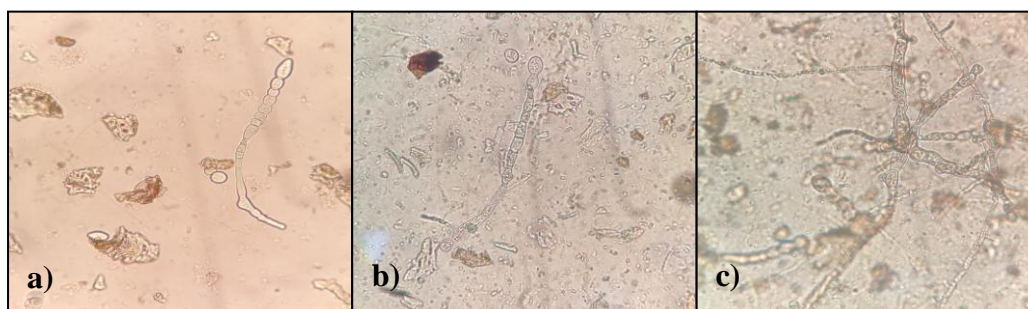
temperatura ne odgovara plijesni za rast (Slika 23.) niti za proizvodnju etanola i drugih proizvoda poput ksilitola i glicerola. Koncentracija etanola stagnerala je kroz cijeli proces uzgoja. Proizvodnja ksilitola bila je neuspješna ( $0 \text{ g L}^{-1}$ ), a prinos glicerola iznosio je  $0,0172 \text{ g L}^{-1}$ .

#### 4.3.2.1. Uzgoj plijesni *M. indicus* u acetatnom puferu na $40 \text{ }^\circ\text{C}$ uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a

U ovom dijelu istraživanja proveden je uzgoj plijesni *M. indicus* u acetatnom puferu uz dodatak 4 % (vol/vol) enzimskog pripravka Cellulase Blend. Dobiveni rezultati prikazani su na Slikama 24. i 25.



**Slika 24.** Promjena koncentracija glukoze, ksiloze, ksilitola, etanola i glicerola tijekom uzgoja u acetatnom puferu na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a



**Slika 25.** Rast plijesni *M. indicus* u acetatnom puferu na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  uz 4 % (vol/vol) Cellulase Blend tijekom 24 sata uzgoja: a) 0 h; b) 8 h; c) 24 h

Na Slici 24. vidi se kontinuirani rast krivulje za etanol, s početne koncentracije od 0,32 g L<sup>-1</sup> do konačne od 1,25 g L<sup>-1</sup>. Proizvodnja ksilitola nije bila uspješna (0 g L<sup>-1</sup>), dok je koncentracija glicerola uglavnom stagnirala kroz cijeli proces uzgoja. Iz krivulja glukoze i ksiloze vidljivo je da je enzimska hidroliza čvrstog dijela zaostalog nakon kiseline predobrade kukuruznih oklasaka bila uspješna. Međutim, zbog temperature od 40 °C koja mu nije optimalna, *M. indicus* nije koristio ove šećere za proizvodnju etanola. Također, na Slici 25. prikazan je rast biomase kroz 24 sata gdje se vidi utjecaj temperature na sam mikroorganizam, odnosno na onemogućavanje njegova rasta.

Nakon provedenih uzgoja plijesni *Mucor indicus* u Erlenmayer tikvicama na 30 i 40 °C dokazano je da je temperatura od 40 °C neadekvatna za uzgoj plijesni. Osim što ne proizvodi etanol, ksilitol i glicerol, ne povećava se niti raste koncentracija biomase. Parametri uspješnosti provedenih uzgoja prikazani su u Tablici 7.

**Tablica 7.** Parametri uspješnosti procesa uzgoja *Mucor indicus* na različitim temperaturama i medijima

Medij i temperatura	Prinos etanola [g <sub>p</sub> g <sub>s</sub> <sup>-1</sup> ]	Prinos glicerola [g g <sup>-1</sup> ]	Prinos ksilitola [g g <sup>-1</sup> ]	Produktivnost procesu [g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
Podloga /30°C	0,0033	0	0	0,0188
Podloga + Cellulase	0,2622	0,014	0,0033	0,1457
<b>Blend/30°C</b>				
Pufer + Cellulase	0,0209	0,0025	0,0019	0,0116
<b>Blend/30°C</b>				
Podloga + Cellulase	0	0,001	0	0
<b>Blend/40°C</b>				
Pufer + Cellulase	0,0232	0	0	0,0387
<b>Blend/40°C</b>				

Izračunati parametri uspješnosti prikazani su kao maksimalni ostvareni prinosi etanola, glicerola i ksilitola te maksimalne ostvarene produktivnosti procesa proizvodnje etanola pri 30 i 40 °C u podlozi i acetatnom puferu.

Proces vođen u podlozi na 30 °C bez dodatka enzima ostvaruje maksimalnu produktivnost procesa (0,0188 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) nakon 7 sati uzgoja. Uzgoj vođen u podlozi na 30 °C uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend-a pokazao se kao najproduktivniji. Nakon 72 sata uzgoja, prinosi etanola (0,2622 g g<sup>-1</sup>), glicerola (0,014 g g<sup>-1</sup>) i ksilitola (0,0033 g g<sup>-1</sup>) su viši

nego u ostalim provedenim uzgojima. Nadalje, dobiveni parametri uspješnosti procesa vođenog u acetatnom puferu dokazuju zadanu pretpostavku da octena kiselina djeluje inhibirajuće na rast i produktivnost plijesni *M. indicus*. Prinosi etanola ( $0,0209 \text{ g g}^{-1}$ ), glicerola ( $0,0025 \text{ g g}^{-1}$ ) i ksilitola ( $0,0019 \text{ g g}^{-1}$ ) nakon 72 sata uzgoja su niži nego kod procesa vođenog u istim uvjetima na podlozi. Produktivnost procesa u acetatnom puferu uz dodatak enzima u 72-om satu uzgoja iznosi  $0,0116 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

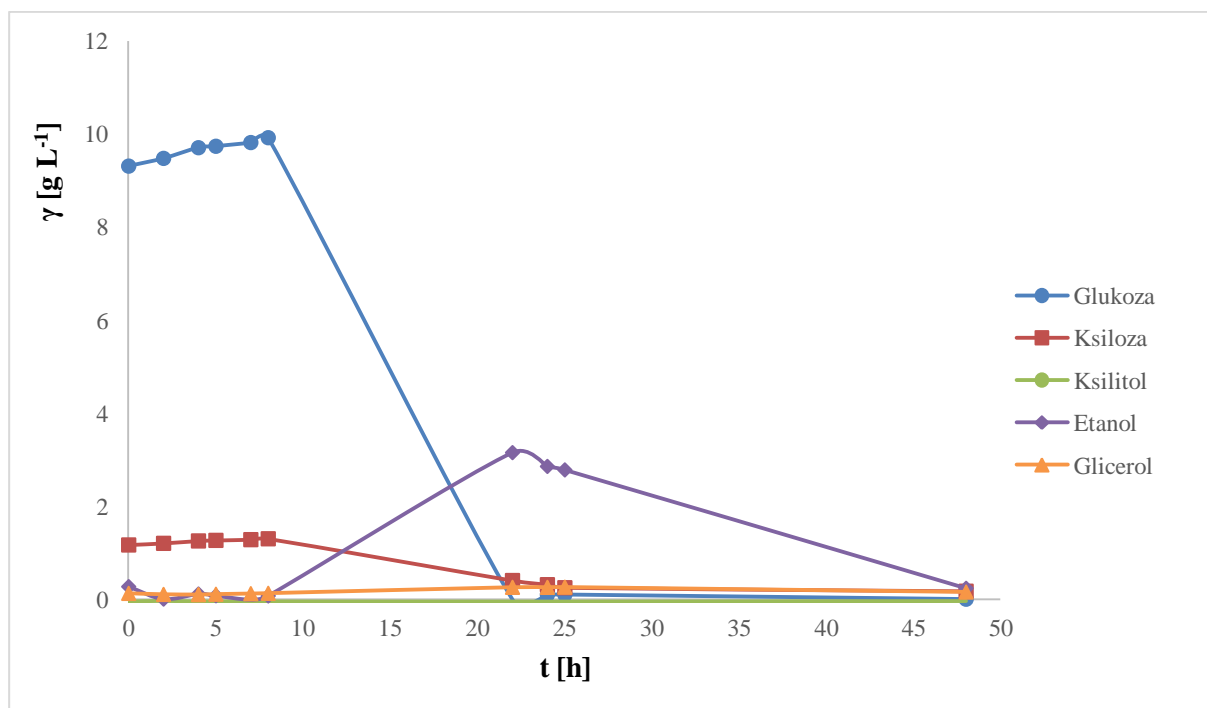
Temperatura od  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  je dokazano previsoka za uzgoj *M. indicus* pa su i produktivnosti procesa proizvodnje etanola vođenih pri toj temperaturi niske. Kod uzgoja u acetatnom puferu nije došlo do proizvodnje ksilitola i glicerola. Navedeni prinosi ksilitola mogu se objasniti nedostatnom količinom zraka tijekom uzgoja, budući da mikroorganizam asimilira ksilozu isključivo u prisutnosti kisika. Prinos etanola iznosi  $0,0232 \text{ g g}^{-1}$ , a produktivnost procesa proizvodnje etanola  $0,0387 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Dobiveni rezultati mogu se usporediti s rezultatima dobivenim u istraživanju Karimi i sur. (2006). Oni su na hidrolizatu rižine slame bez dodatka enzima na temperaturi od  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  te aerobnom načinu uzgoja dobili prinose etanola od  $0,2 \text{ g g}^{-1}$  što je nešto manje od prinosa etanola ( $0,2622 \text{ g g}^{-1}$ ) dobivenog uzgojem u podlozi uz Cellulase Blend (4 % vol/vol) na  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Produktivnost u navedenom istraživanju iznosila je  $0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  što je više od produktivnosti dobivene u ovom istraživanju u istim uvjetima ( $0,0188 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) na predobrađenim kukuruznim oklascima kao supstratu. Prinosi glicerola i ksilitola su  $0,04 \text{ g g}^{-1}$  i  $0,14 \text{ g g}^{-1}$ , nešto viši od rezultata dobivenih u ovom radu.

Iz dobivenih rezultata zaključeno je da *M. indicus* ne može rasti na  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  te da je temperatura od  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  optimalna za rast biomase i proizvodnju etanola i ostalih proizvoda. Ujedno se uvidjelo da je podloga najbolja podloga za uzgoj u većem mjerilu te da je za efikasnu enzimsku hidrolizu potreban dodatak enzimskog pripravka Cellulase Blend.

#### 4.4. Uzgoj plijesni *M. indicus* u bioreaktoru s miješalom

Uzgoj *M. indicus* u većem mjerilu proveden je na temelju rezultata dobivenih u prethodnim dijelovima istraživanja. Proces se vodio tehnikom simultane saharifikacije i fermentacije u bioreaktoru s miješalom volumena 1,5 L (Poglavlje 3.2.6., Materijali i metode). Temperatura je sukladno prethodnim rezultatima održavana na 30 °C, a kao podloga je korištena podloga pripremljena na način opisan u Poglavlju 3.1.6.4. (Materijali i metode). U podlogu je na početku procesa dodan enzimski pripravak Cellulase Blend u koncentraciji od 4 % kako bi se poboljšala efikasnost enzimске hidrolize te posljedično i fermentacije dobivenih šećera. Proces je vođen aerobno kroz 48 sati uz protok zraka od 4 L min<sup>-1</sup> te uz broj okretaja miješala 200 o min<sup>-1</sup>. Nakon provedenog uzgoja odredila se koncentracija dobivenih proizvoda. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 26.



**Slika 26.** Promjena koncentracije glukoze, ksiloze etanola, glicerola i ksilitola tijekom uzgoja u bioreaktoru s miješalom uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend

Na Slici 26. prikazane su promjene koncentracija supstrata i produkata tijekom uzgoja *M. indicus* u bioreaktoru s miješalom. Koncentracija glukoze blago raste tijekom prvih 8 sati uzgoja, s početnih 9,31 g L<sup>-1</sup> do 9,92 g L<sup>-1</sup> u osmom satu, nakon čega naglo pada. Koncentracija ksiloze se kroz prvih 8 sati minimalno povećava s 1,17 g L<sup>-1</sup> do 1,29 g L<sup>-1</sup>. Međutim, nakon što je koncentracija glukoze u 22-om satu pala na nulu, *M. indicus* počinje

asimilirati ksilozu te njezina koncentracija na kraju procesa iznosi  $0,17 \text{ g L}^{-1}$ . Proizvodnja etanola započela je u osmom te kontinuirano raste do maksimuma u 22. satu uzgoja koji iznosi  $3,15 \text{ g L}^{-1}$ . *M. indicus* nakon 22 sata uzgoja, usporedno s potrošnjom ksiloze za rast počinje koristiti i etanol što se primjećuje u 24. satu uzgoja ( $2,85 \text{ g L}^{-1}$ ) te njegova koncentracija kontinuirano pada do kraja procesa. U 48 satu uzgoja koncentracija etanola iznosi  $0,23 \text{ g L}^{-1}$ . Prinos etanola nakon 22 sata uzgoja iznosi  $0,0788 \text{ g g}^{-1}$ . Tijekom procesa nije došlo do proizvodnje ksilitola. Međutim, ksilitol nije poželjan nusproizvod procesa proizvodnje etanola budući da negativno utječe na prinose etanola (Karimi i Zamani, 2013). Koncentracija glicerola kontinuirano raste s početne koncentracije od  $0,13 \text{ g L}^{-1}$  do maksimuma u 25-om satu uzgoja koji je iznosio  $0,26 \text{ g L}^{-1}$ . Tijekom zadnja 24 sata uzgoja, koncentracija glicerola pada do  $0,15 \text{ g L}^{-1}$ . Prinos glicerola u ovom procesu iznosi  $0,0033 \text{ g g}^{-1}$ . Maksimalna produktivnost procesa postignuta je u 22-om satu uzgoja, a iznosi  $0,1433 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Biomasa plijesni *M. indicus* koristi se za proizvodnju različitih proizvoda poput hitozana, lipida i raznih polimera (Soltani i sur., 2017), te je stoga nakon provedenog uzgoja biomasa izdvojena u svrhu izolacije glukozamina, osnovne građevne jedinice hitozana. Metoda izolacije opisana je u Poglavlju 3.3.13. (Materijali i metode), a uzorci su analizirani UPLC analizom (Poglavlje 3.2.5., Materijali i metode). Na prinos dobivenog glukozamina utječu koncentracija i omjer korištene kiseline i hitina/hitozana, temperatura i reakcijsko vrijeme (Soltani i sur., 2017). Osim toga, bitan utjecaj ima i kristaličnost samog hitozana. Povećanjem kristaličnosti smanjuje se dostupnost polimernih lanaca za efektivno djelovanje kiseline tijekom kiselinske hidrolize (Zamani i sur., 2008). Nakon provedene izolacije, dobivene koncentracije glukozamina su bile vrlo niske (ispod  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) što ukazuje na to da je u svrhu dobivanja glukozamina iz biomase plijesni *Mucor indicus* potrebna daljnja optimizacija procesa.

ZAKLJUČCI



## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Čvrsti dio zaostao nakon kiselinske predobrade kukuruznih oklasaka sastoji se od 55,58 % glukana, 8,02 % ksilana, 0,0 % arabinana, 2 % lignina topivog u kiselini, 28,01 % lignina netopivog u kiselini te sadrži 0,05 mg L<sup>-1</sup> furana.
2. Najbolji enzimski pripravak za enzimsku hidrolizu predobrađenih kukuruznih oklasaka u acetatnom puferu je Cellulase Blend u koncentraciji od 10 % (vol/vol) na temperaturi od 40 °C. Stupanj hidrolize glukana iznosio je 85,80 %, stupanj hidrolize ksilana 33,64 %, a stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata 79,09 %.
3. Enzimskom hidrolizom predobrađenih kukuruznih oklasaka u podlozi koja je sadržavala kvašćev ekstrakt, diamonijev fosfat i diamonijev sulfat uz 10 % (vol/vol) Cellulase Blend dobivene su najviše uspješnosti hidrolize glukana od 100 % i ukupnih ugljikohidrata od 89,90 %, a stupanj hidrolize ksilana iznosio je 21,77 %.
4. Kod uzgoja u Erlenmayer tikvicama, najuspješniji bioproces u kojem je ostvarena produktivnost proizvodnje etanola od 0,1457 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> vođen je na podlozi koja je sadržavala predobrađene kukuruzne oklaske, kvašćev ekstrakt, diamonijev fosfat i diamonijev sulfat uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend pri 30 °C.
5. *Mucor indicus* pri 30 °C u podlozi koja je sadržavala predobrađene kukuruzne oklaske, kvašćev ekstrakt, diamonijev fosfat i diamonijev sulfat bez dodanog enzimskog pripravka ne sintetizira dovoljnu količinu ekstracelularnih enzima za efikasnu enzimsku hidrolizu predobrađenih kukuruznih oklasaka. Produktivnost procesa iznosi 0,0188 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.
6. *Mucor indicus* u uzgoju provedenom na predobrađenim kukuruznim oklascima u acetatnom puferu te uz 4 % (vol/vol) Cellulase Blend pri 40 °C zbog suboptimalnih uvjeta daje nisku produktivnost od 0,0387 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> u odnosu na produktivnosti dobivene pri 30 °C.
7. Uzgojem plijesni *Mucor indicus* u bioreaktoru s miješalom na podlozi koja je sadržavala predobrađene kukuruzne oklaske, kvašćev ekstrakt, diamonijev fosfat i diamonijev sulfat pri temperaturi od 30 °C te uz dodatak 4 % (vol/vol) Cellulase Blend ostvarena je produktivnost od 0,1433 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

## LITERATURA

## 6. LITERATURA

Abedinifar, S., Karimi, K., Khanahmadi, M., Taherzadeh, M. J. (2009) Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. *Biomass Bioenerg.* **33**, 828 – 833.

Aghbashlo, M., Tabatabaei, M., Karimi, K. (2016) Exergy-based sustainability assessment of ethanol production via *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. *Energ.* **98**, 240 – 252.

Alvarez, C., Reyes-Sosa, F. M., Diez, B. (2016) Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microb. Technol.* **9**, 49 – 156.

Anonymus 1 (2019) Easy Chem < <https://easychem.com.au/production-of-materials/biomass-research/cellulose/> > . Pristupljeno 21. srpnja 2019.

Anonymus 2 (2009) Wikimedia Commons < <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Xylan.svg> > . Pristupljeno 21. srpnja 2019.

Anonymus 3 (2012) Wikimedia Commons <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glucosamine\\_Structural\\_Formulae\\_V.1.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glucosamine_Structural_Formulae_V.1.svg)>. Pristupljeno 12. kolovoza 2019.

Behera, S., Singh, R., Arora, R., Sharma N. K., Shukla, M., Kumar, S. (2015) Scope of algae as third generation biofuels. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2**, 90.

Binod, P., Sindhu, R., Pandey A. (2013) The alcohol fermentation step: The most common ethanologenic microorganisms among yeasts, bacteria and filamentous fungi. U: Lignocellulose conversion - enzymatic and microbial tools for bioethanol production, (Faraco, V., ured.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, London/ New York, str. 131-149.

Chandel, A. K., Chan, E. S., Rudravaram, R., Lakshmi Narasu, M., Venkateswar Rao, L., Ravindra, P. (2013) Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Afr. J. Environ. Econ. Manage.* **1** (5), 126 – 143.

Choudhary, J., Surender, S., Lata, N. (2016) Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic biomass. *Electron. J. Biotechn.* **21**, 82 – 92.

- Correa, D. F., Beyer, H. L., Fargione, J. E., Hill, J. D., Possingham, H. P., Thomas-Hall, S. R., Schenk, P. M. (2019) Towards the implementation of sustainable biofuel production systems. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **107**, 250 – 263.
- Cutrim, F. M., Ramos, E. C. S. S., Abreu, M. C. C., Godinho, A. S., Maciel, A. P., Mendonca, C. J. S., Cavalcante, K. S. B. (2019) A study of chemical composition and enzymatic hydrolysis of solid organic waste. *J. Braz. Chem.* **30**, 1955 – 1963.
- Galbe M., Zacchi G. (2007) Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. U: *Biofuels. Advances in biochemical engineering/biotechnology*, Volume 108, (Olsson, L., ured.), Springer, Berlin Heidelberg, str. 41 – 65.
- Gelenčir, M. (2019) Srednja.hr < <https://www.srednja.hr/kultura/vijesti-kultura/svako-selo-svoj-naziv-vi-kazete-drvenstu-sredinu-kukuruznog-klipa/>>. Pristupljeno 18. kolovoza 2019.
- Gray, K. A., Zhao, L., Emptage, M. (2006) Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**, 141–146.
- Guerriero, G., Hausman, J. F., Strauss, J., Ertan, H., Siddiqui, K. S. (2015) Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Eng. Life Sci.* **16**, 1 – 16.
- Guo, M., Song, W., Buhain, J. (2015) Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **42**, 712–725.
- Ivančić Šantek, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek, B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kem. Ind.* **65**, 25–38.
- Ivančić Šantek, M., Zvonar, I., Beluhan, S., Šantek, B. (2018) Proizvodnja bioetanola iz kukuruznih oklasaka. *Kem. Ind.* **67**, 297 – 308.
- Janda, K., Kourilek, J. (2016) Description of biofuels and shale gas development. *Munich Personal RePEc Archive*, Paper No. 74885.
- Janda, K., Kristoufek, L., Zilberman, D. (2012) Biofuels: policies and impacts. *Agric. Econ. – Czech* **58**, 372 – 386.
- Javanbakht, V., Zilouei, H., Karimi, K. (2011) Lead biosorption by different morphologies of fungus *Mucor indicus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **65**, 294 – 300.

- Jensen, C. U., Rodriguez Guerrero, J. K., Karatzos, S., Olofsson, G., Iversen, S. B. (2017) Fundamentals of Hydrofaction<sup>TM</sup>: Renewable crude oil from woody biomass. *Biomass Conv. Bioref.* **7** (4), 495 – 509.
- Karimi, K., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2008) *Mucor indicus* as a biofilter and fermenting organism in countinuous ethanol production from lignocellulosic hydrolyzate. *Biochem. Eng. J.* **39**, 383 – 388.
- Karimi, K., Emtiazi, G., Taherzadeh, M. J. (2006) Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochem.* **41**, 653 – 658.
- Karimi, K., Zamani, A. (2013) *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. *Biotechnol. Adv.* **31**, 466 – 481.
- Koh, P. L., Ghazoul, J. (2008) Biofuels, biodiversity and people: Understanding the conflict and finding opportunities. *Biol. Conserv.* **141**, 2450-2460.
- Kumar, S., Singh, S. P., Mishra, I. M., Adhikari, D. K. (2009) Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. *Chem. Eng. Technol.* **32**, 517 – 526.
- Lennartsson, P. R., Karimi, K., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2009) Effects of different growth forms of *Mucor indicus* on cultivation on dilute-acid lignocellulosic hydrolyzate, inhibitor tolerance, and cell wall composition. *J. Biotechnol.* **143**, 255 – 261.
- Lukajtis, R., Rybarczyk, P., Kucharska, K., Konopacka-Lyskawa, D., Slupek, E., Wychodnik, K., Kaminski, M. (2018) Optimization of saccharification conditions of lignocellulosic biomass under alkaline pre-treatment and enzymatic hydrolysis. *Energies* **11**, 886 – 913.
- Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M., Guimaraes, V. M. (2015) Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Curr. Opin. Food Sci.* **1**, 44 – 49.
- Maurya, D.P., Singla, A., Negi, S. (2015) An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech* **5**, 597 – 609.
- McIntosh, S., Palmer, J., Zhang, Z., Doherty, W. O. S., Yazdani, S. S., Sukumaran, R. K., Vancov, T. (2017) Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated *Eucalyptus grandis* under high solids loading. *Ind. Biotechnol.* **13**, 131 – 139.

- McKendry, P. (2002) Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresour. Technol.* **83**, 37–46.
- Meinita, M. D. N., Marhaeni, B., Jeong, G., Hong, Y. (2019) Sequential acid and enzymatic hydrolysis of carrageenan solid waste for bioethanol production: A biorefinery approach. *J. Appl. Phycol.* **31**, 2507 – 2515.
- Milatti, R., Karimi, K., Edebo, L., Niklasson, C., Taherzadeh, M. J. (2008) Ethanol production from xylose and wood hydrolyzate by *Mucor indicus* at different aeration rates. *BioResources* **3**, 1020 – 1029.
- Mohammadi, M., Zamani, A., Karimi, K. (2013) Effect of phosphate on glucosamine production by ethanolic fungus *Mucor indicus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171**, 1465 – 1472.
- Morales, M., Quintero, J., Conejeros, R., Aroca, G. (2015) Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **42**, 1349 – 1361.
- Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J. L., Coton, E. (2016) Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiol.* **56**, 69 – 79.
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Milagres, A. M. F., Roberto, I. C. (2008) Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme Microb. Technol.* **43**, 124 – 129.
- Niglio, S., Procentese, A., Russo, M. E., Sannia, G., Marzocchella, A. (2019) Investigation of enzymatic hydrolysis of coffee silverskin aimed at the production of butanol and succinic acid by fermentative processes. *Bioenerg. Res.* **12**, 312 – 324.
- Orzali, L., Corsi, B., Forni, C., Riccioni, L. (2017) Chitosan in agriculture: A new challenge for managing plant disease. U: Biological activities and application of marine polysaccharides, (Shalaby, E. A., ured.), InTech, Rijeka, str. 17 – 36.
- Procentese, A., Johnson, E., Orr, V., Garruto Campanile, A., Wood, J.A., Marzocchella, A., Rehmann, L. (2015) Deep eutectic solvent pretreatment and subsequent saccharification of corncob. *Bioresour. Technol.* **192**, 31 – 36.

Ravi Kumar, M. N. V. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* **46**, 1 – 27.

Renewable Fuels Association (2019) < <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>> . Pristupljeno 21. srpnja 2019.

Rezić, T., (2012) Interna skripta iz kolegija Biotehnologija III, Prehrambeno biotehnoški fakultet, Zagreb.

Rezić, T., Ivančić Šantek, M., Andlar, M., Pavlečić, M., Šantek, B. (2016) Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanol iz lignoceluloznih sirovina. *Croat. J. Food Techn. Biotechnol. Nutr.* **11**, 6 – 17.

Rosegrant, M. W. (2008) Biofuels and grain prices: Impacts and policy responses. International Food Policy Research Institute, Washington.

Safaei, Z., Karimi, K., Golkar, P., Zamani, A. (2015) Effects of plant growth hormones on *Mucor indicus* growth and chitosan and ethanol production. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 16683 – 16694.

Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., Aikat, K. (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew. Energy* **37**, 19 – 27.

Satari, B., Karimi, K., Zamani, A. (2016) Oil, chitosan, and ethanol production by dimorphic fungus *Mucor indicus* from different lignocelluloses. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **91**, 1835 – 1843.

Semenčenko, V., Mojović, Lj., Petrović, S., Očić, O. (2011) Novi trendovi u proizvodnji bioetanol. *Hem. Ind.* **65**, 103–114.

Shahbandeh, M. (2019) Corn production by country< <https://www.statista.com/statistics/254292/global-corn-production-by-country/>>. Pristupljeno 23. kolovoza 2019.

Sharifia, M., Karimi, K., Taherzadeh, M. J. (2008) Production of ethanol by filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 1253 – 1259.

- Sharifyazd, S., Karimi, K. (2017) Effects of fermentation conditions on valuable products of ethanolic fungus *Mucor indicus*. *Electron. J. Biotechn.* **30**, 77 – 82.
- Sharma, H. K., Xu, C., Qin, W. (2019) Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: An overview. *Waste Biomass Valor.* **2**, 235 - 251.
- Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. (2016) Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresour. Technol.*, **199**, 76–82.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. (2012) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure (LAB). NREL technical report.
- Soltani, M., Karimi, K., Zamani, A. (2017) Fungal glucosamine: Production, purification, and characterization. *Int. J. Res. Stud. Biosci.* **5**, 56 – 64.
- Sues, A., Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2005) Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Res.* **5**, 669 – 676.
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., Sun, R. (2016) The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technol.* **199**, 49 – 58.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: An overview. *Bioresour. Technol.* **11**, 678-680.
- 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.
- Uredba o kakvoći biogoriva (2005) *Narodne novine* **141**, Zagreb.
- Van Eynen, D., Van Dongen, F., Kabel, M., De Bont, J. (2011) Corn fiber, cobs and stover: Enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment. *Bioresour. Technol.* **102**, 5995 – 6004.
- Velmurugan, R., Incharoensakdi, A. (2018) Nanoparticles and organic matter: Process and impact. U: *Nanomaterials in plants, algae and microorganisms: Concepts and controversies: Volume One*, (Tripathi, D. K., Ahmad, P., Sharma, S., Chauhan, D. K., Dubey, N. K., ured.), Academic Press, London/San Diego, str. 407 – 428.



Weng, J. K., Li, X., Bonawitz, N. D., Chapple, C. (2008) Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Curr. Opin. Biotech.* **19**, 166–172.

Wyman, C. E., Cai, C. M., Kumar, R. (2019) Bioethanol from lignocellulosic biomass. U: Energy from organic materials (biomass), (Kaltschmitt, M., ured.), Encyclopedia of sustainability science and technology series. Springer, New York.

Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J., Saddler, J. N. (2004) Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. U: Proceedings of the twenty-fifth symposium on biotechnology for fuels and chemicals, (Finkelstein, M., McMillan, J. D., Davison, B. H., Evans, B., ured.), Humana Press, Breckenridge, Totowa, NJ.

Zamani, A., Jeyhanipour, A., Edebo, L., Niklasson, C., Taherzadeh, M. J. (2008) Determination of glucosamine and N-acetyl glucosamine in fungal cell walls. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 8314 – 8318.

Zvonar, I., (2016) Proizvodnja celuloitičkih enzima s plijesni *Trichoderma reesei* i optimizacija enzimske hidrolize kukuruznog oklaska, Diplomski rad, Prehrambeno biotehnoški fakultet, Zagreb.

PRILOZI

## 7. PRILOZI

### 4.5. Baždarni pravci za određivanje koncentracije supstrata i proizvoda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Tablica 8. Retencijska vremena i baždarni pravci (HPLC)

spoj	$t_R$ [min]	jednadžba baždarnog pravca	$R^2$ [-]
glukoza	13,021	$A = 377242,19 \gamma(\text{glukoza}) - 4487,06$	1,00
ksiloza	13,813	$A = 362057,09 \gamma(\text{ksiloza}) + 5598,61$	1,00
etanol	27,464	$A = 1163351,70 \gamma(\text{etanol}) - 953,28$	1,00
ksilitol	15,760	$A = 362963,41 \gamma(\text{ksilitol}) + 9251,37$	1,00
octena kiselina	19,936	$A = 164952,59 \gamma(\text{octena kiselina}) + 2260,96$	1,00
glicerol	18,183	$A = 298199,58 \gamma(\text{glicerol}) + 7203,54$	1,00
celobioza	10,760	$A = 378874,5985 \gamma(\text{celobioza}) - 797,7069$	1,00

### 4.6. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije supstrata i proizvoda tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti

Tablica 9. Retencijska vremena i baždarni pravci (UPLC)

spoj	$t_R$ [min]	jednadžba baždarnog pravca	$R^2$ [-]
glukoza	5,06	$A = 83241 \gamma(\text{glukoza}) + 11510$	0,9986
ksiloza	3,75	$A = 66325 \gamma(\text{ksiloza}) + 9629,3$	0,9997
celobioza	7,98	$A = 73880 \gamma(\text{celobioza}) + 10635$	0,9998
etanol	11,1	$A = 361300 \gamma(\text{etanol}) + 27469$	0,9996
ksilitol	5,8	$A = 147029 \gamma(\text{ksilitol}) + 3656,8$	0,9995
glicerol	7,0	$A = 120817 \gamma(\text{glicerol}) - 3671,6$	0,9997
glukozamin	3,3	$A = 33376 \gamma(\text{glukozamin}) - 5099,9$	0,998

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Petra Jedrejčić

Ime i prezime studenta