

Predobrada bukovine

Buovac, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:244217>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Marko Buovac
7431/BT

PREDOBRADA BUKOVINE
ZAVRŠNI RAD

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

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac

Zagreb, 2020.

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

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Vlatki Petravić Tominac na predloženoj temi, stručnoj pomoći, savjetima, a osobito strpljenju pri izradi ovog rada.

Najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji na podršci tijekom cijelog svog dosadašnjeg školovanja.

Zahvala mojim dragim prijateljima i psu na lijepim trenutcima i podršci. Također, posebno hvala prijatelju i kolegi Dorijanu Deviću na pruženoj pomoći u izradi ovog rada.

"Ko ne zna, a ne zna da ne zna - opasan je - izbjegavajte ga! Ko ne zna, a zna da ne zna - dijete je - naučite ga! Ko zna, a ne zna da zna – spava - probudite ga! Ko zna i zna da zna - mudar je - slijedite ga!"

Konfucije

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

PREDOBRADA BUKOVINE

Marko Buovac, 0058210796

Sažetak: Potencijalne lignocelulozne sirovine u Republici Hrvatskoj, koje bi se mogle koristiti kao temelj buduće biotehnološke proizvodnje, su otpad koji nastaje u poljoprivredi, šumarstvu, prehrambenoj i drvenoj industriji. Glavne komponente lignoceluloznih sirovina su celuloza, hemiceluloza i lignin. Kako bi se dobili fermentabilni šećeri, koje radni mikroorganizmi mogu metabolizirati, potrebno je podvrgnuti kompleksne lignocelulozne sirovine određenim postupcima predobrade i hidrolize. Cilj je postići što veći stupanj hidrolize hemiceluloze, ukloniti lignin te smanjiti kristaliničnost celuloze. Metode predobrade dijele se na fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke, a treba ih prilagoditi ovisno o sastavu sirovine koja se koristi. U radu su opisani primjeri predobrade tvrdog drveta s naglaskom na bukovinu te njihove prednosti i nedostatci.

Ključne riječi: bukovina, lignoceluloza, predobrada, tvrdo drvo

Rad sadrži: 36 stranica, 22 slike, 15 tablica, 34 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) pohranjen u: Knjižnica
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

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

Rad predan: 15. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

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

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

PRETREATMENT OF BEECH WOOD

Marko Buovac, 0058210796

Abstract: Potential lignocellulosic raw materials in Croatia, which could be used as the basis of future biotechnological production, are wastes derived from agriculture, forestry, food and wood industries. The main components of lignocellulose raw materials are cellulose, hemicellulose and lignin. In order to obtain fermentable sugars, which can be metabolized by working microorganisms, it is necessary to subject the complex lignocellulosic raw materials to certain pretreatment and hydrolysis procedures. The aim is to achieve the highest percentage of hemicellulose hydrolysis, to remove lignin and to reduce the crystallinity of cellulose. Pretreatment methods are divided into physical, chemical, physico-chemical and biological, and need to be adjusted depending on the composition of the used raw material. The paper describes examples of hardwood pretreatment with an emphasis on the beech wood as well as their advantages and disadvantages.

Keywords: beech wood, hard wood, lignocellulose, pretreatment

Thesis contains: 36 pages, 22 figures, 15 tables, 34 references

Original in: Croatian

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

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

Thesis delivered: September 15th 2020.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Kemijski sastav lignoceluloznih sirovina.....	3
2.1.1. Celuloza.....	4
2.1.2. Hemiceluloza.....	5
2.1.3. Lignin.....	6
2.2. Tvrdo drvo (bukva) kao biotehnoška sirovina.....	9
2.3. Metode predobrade lignoceluloznih sirovina	13
2.3.1. Predobrada tvrdog drveta.....	16
3. ZAKLJUČAK.....	33
4. LITERATURA.....	34

1. Uvod

Značajan porast potrošnje neobnovljivih izvora energije (nafta, ugljen i prirodni plin) zbog ubrzanog razvoja svjetskog gospodarstva uzrokuje brže iscrpljivanje njihovih zaliha i povećanje emisije stakleničkih plinova (Ivančić Šantek i sur., 2016). Biomasa je obnovljivi izvor energije te predstavlja alternativu fosilnim izvorima energije. Najzastupljenija i najdostupnija biomasa na Zemlji je lignocelulozna biomasa te zbog toga ima potencijal biti sirovina za proizvodnju biogoriva i biokemikalija (Isikgor i Becer, 2015).

Lignoceluloza je sastavni dio stanične stijenke biljnih stanica, a glavne komponente ove kompleksne strukture su celuloza, hemiceluloza i lignin. Udio pojedinih komponenata ovisi o vrsti i dijelu biljke te vanjskim čimbenicima (Sun i Cheng, 2002). Kroz prizmu ekološkog stajališta, trebali bi se promatrati otpadni dijelovi lignoceluloznih sirovina za proizvodnju biogoriva i biokemikalija. Tu primjerice spadaju poljoprivredni ostaci (npr. pšenična ili ječmena slama, kukuruzni oklasak), ostaci drvno-prerađivačke industrije i slično (Ivančić Šantek i sur., 2016). Velika prednost lignoceluloznih sirovina, naspram ostalih izvora biomase (šećerne i škrobne sirovine), je to što ne konkuriraju na tržištu hrane te im je zbog toga i cijena niža i stabilnija (Rezić i sur., 2016).

Krucijalni i najzahtjevniji korak u proizvodnji biogoriva i biokemikalija iz lignoceluloznih sirovina je predobrada. Tijekom predobrade struktura i kemijski sastav lignoceluloznih sirovina se mijenja. Cilj je postići što veći stupanj hidrolize hemiceluloze, ukloniti lignin te smanjiti kristaliničnost celuloze, povećati poroznost i aktivnu površinu celuloze kako bi bila dostupna za kasniju hidrolizu celulazama (Amin i sur., 2017). Pet osnovnih metoda predobrade su fizikalna, kemijska, fizikalno-kemijska, biološka te enzimsko, od kojih se svaka može provesti na više načina i kombinacija (Ceballos i sur., 2015). Nakon predobrade slijedi proces u bioreaktoru (saharifikacija i fermentacija), koji je potrebno optimirati ovisno o vrsti korištene sirovine i odabranoj metodi predobrade.

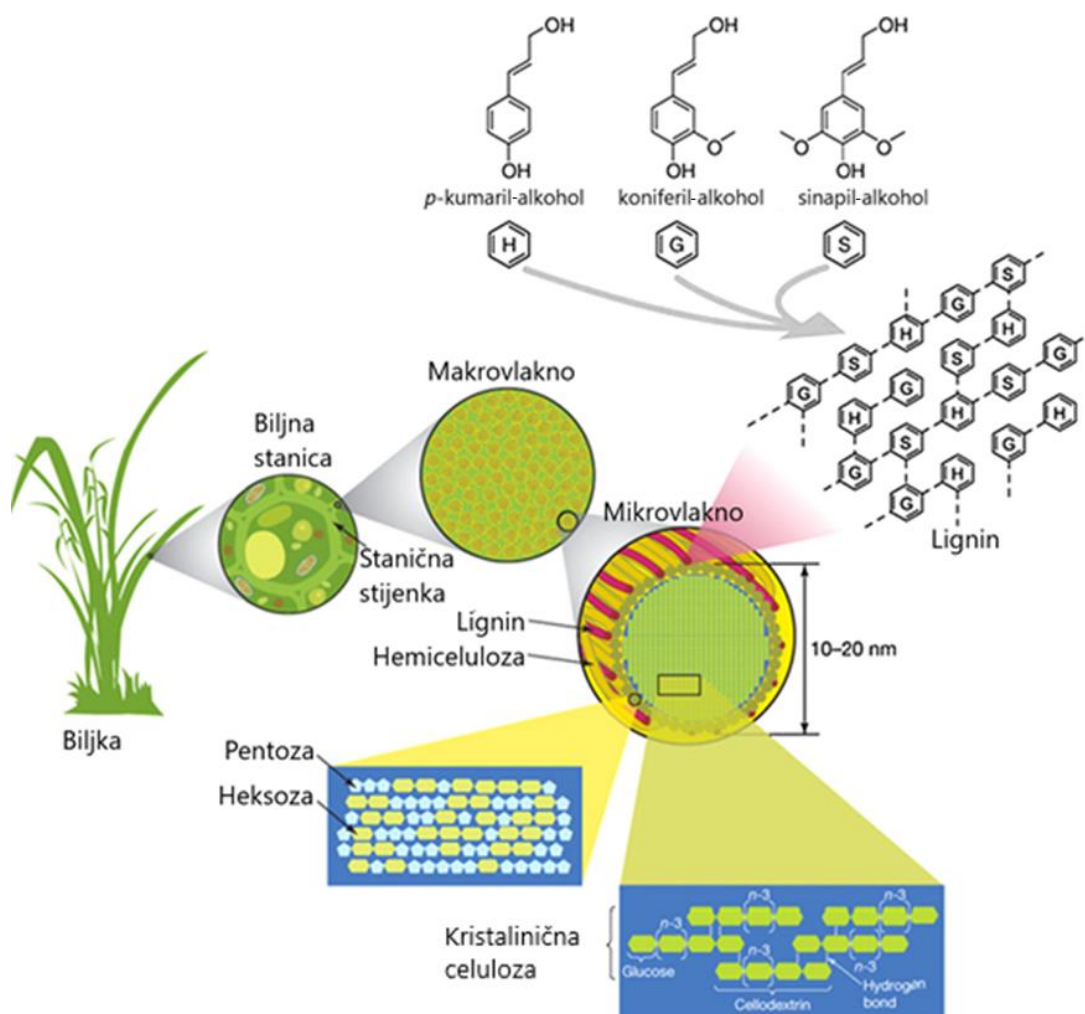
Obična bukva (*Fagus sylvatica*) je najmnogodrvnija vrsta u Republici Hrvatskoj (Ištvančić i sur., 2008). Obzirom da u šumarstvu i drvno-prerađivačkoj industriji nastaje mnogo neiskorištenog otpada (Strategija gospodarenja otpadom Republike Hrvatske, NN 178/05), biomasa bukve ima veliki potencijal kao lignocelulozna sirovina za proizvodnju biogoriva i biokemikalija.

Cilj ovog rada je prikupiti informacije dostupne iz postojeće literature o predobradi bukovine i komentirati dobivene rezultate. U slučaju nedostatka literature, kao alternativa su uzeti radovi o predobradi tvrdog drveta, s ciljem moguće primjene na predobradu bukovine.

2. Teorijski dio

2.1. Kemijski sastav lignoceluloznih sirovina

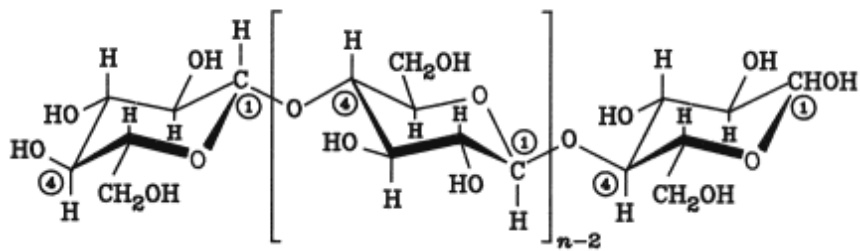
Najveći i najdostupniji izvor biomase na Zemlji su lignocelulozne sirovine. Lignoceluloza je glavni gradivni element stanične stijenke drvenastih i nedrvenastih biljaka (Marić, 2000). U njihovim primjerice spadaju poljoprivredni otpaci (stabljika, oklasak i kumušina kukuruza, trava, bagasa šećerne trske), otpaci drvoprerađivačke industrije (piljevina i strugotine, otpatci papirne industrije), otpatci prehrambene industrije, energetski usjevi i komunalni otpadni papir (Ivančić Šantek i sur., 2016). Glavne komponente lignoceluloznih sirovina su celuloza, hemiceluloza i lignin (Slika 1.), a njihov udio ovisi o vrsti i dijelu biljke te vanjskim čimbenicima. Primjerice, u tvrdom drvu, u koje spada i bukva, je udio celuloze 40 - 55 %, hemiceluloze 24 - 40 %, a lignina 18 - 25 % (Sun i Cheng, 2002).



Slika 1. Struktura stanične stijenke i lignoceluloze (Nunes i Kunamneni, 2018).

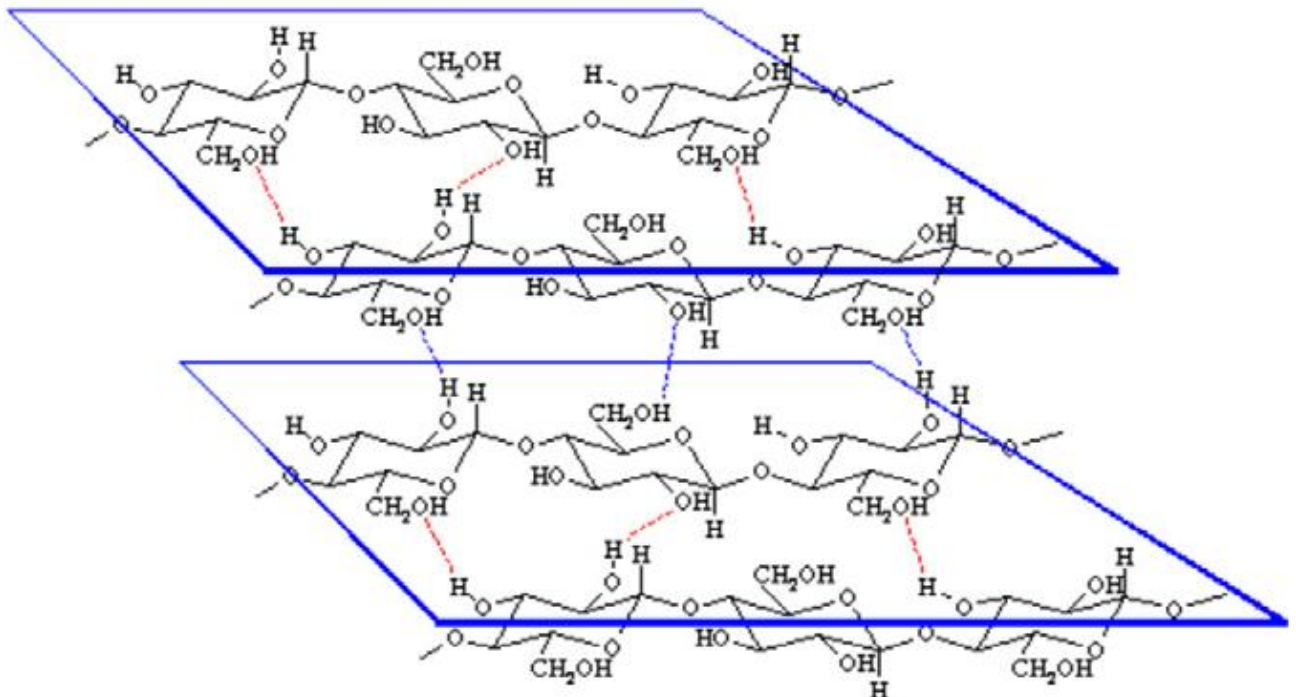
2.1.1. Celuloza

Celuloza je glavni sastojak staničnih stijenki biljnih stanica. Sastoji se od D-glukočnih jedinica međusobno povezanih β -1,4-glikozidnim vezama i tako nastaju dugi ravni lanci molekule celuloze (Pine, 1984). Dakle, to je homopolisaharid D-glukoze, kemijske formule $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Harmsen i sur., 2010). Strukturna formula nalazi se na Slici 2.



Slika 2. Strukturna formula jedne molekule celuloze (Harmsen i sur., 2010).

Broj glukočnih jedinica koje čine jednu molekulu glukoze, naziva se stupanj polimerizacije (engl. degree of polymerization, DP). Stupanj polimerizacije celuloze za bukvu iznosi 4050 (Hallac i Ragauskas, 2011). Vodikove veze između molekula celuloze uzrokuju paralelno povezivanje lanaca celuloze, što je i prikazano na Slici 3. (Faulon i sur., 1994).

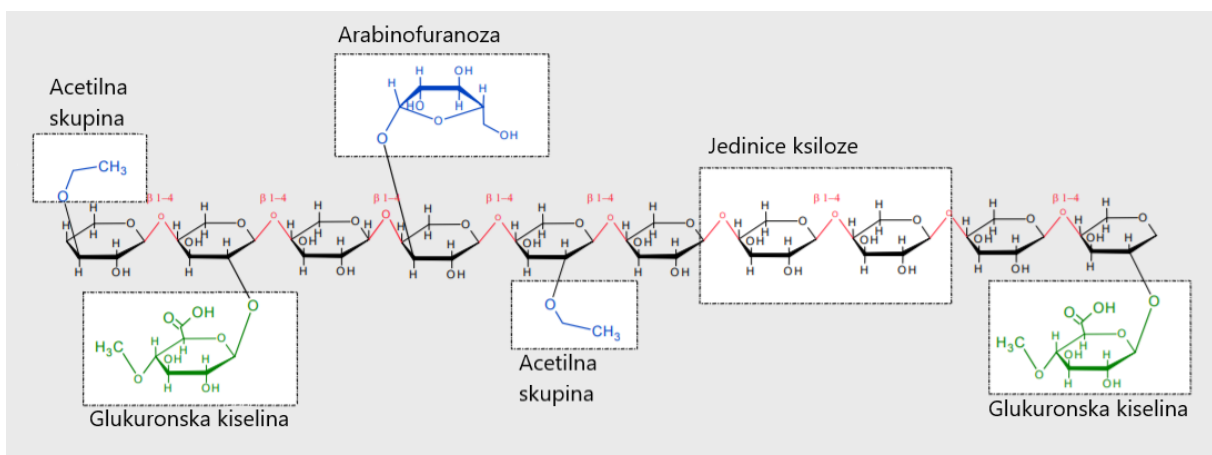


Slika 3. Prikaz vodikovih veza koje omogućuju paralelni raspored celuloznih polimernih lanaca (Harmsen i sur., 2010).

Celuloza se pojavljuje u kristaliničnom i amorfnom obliku te stvara mikrovlakna i makrovlakna (Chen, 2014; Slika 1.). Fibrilna struktura razlog je zašto je celuloza otporna na kemijske reakcije (Pine, 1984). Nadalje, celuloza je vrlo higroskopna, no nije topljiva u vodi, već u kontaktu s njom nabubri. Zbog navedenih svojstava, da bi celuloza poslužila kao izvor glukoze dobivene njenom hidrolizom, važno je primijeniti odgovarajuću metodu predobrade. Naime, treba uzeti u obzir da se celulozna vlakna još i povezuju u kompleksnu strukturu (Slika 1.), s hemicelulozom i ligninom, što predstavlja dodatni izazov za razgradnju do fermentabilnih šećera.

2.1.2. Hemiceluloza

Termin hemiceluloza podrazumijeva grupu heteropolisaharida koji se nalaze u staničnoj stijenci biljnih stanica, kao što su na primjer arabinoksilani, glukomanani i galaktani. Hemiceluloza je sastavljena od pentoza (ksiloza, arabinoza), heksoza (manoza, glukoza, galaktoza) te šećernih kiselina (glukuronska, metilglukuronska, galakturonska kiselina). Sastav hemiceluloze razlikuje se od biljke do biljke. U tvrdom drvu okosnica je ksilan, na kojeg se vežu arabinoza i glukuronska kiselina i to je prikazano na Slici 4. (Harmsen i sur., 2010).



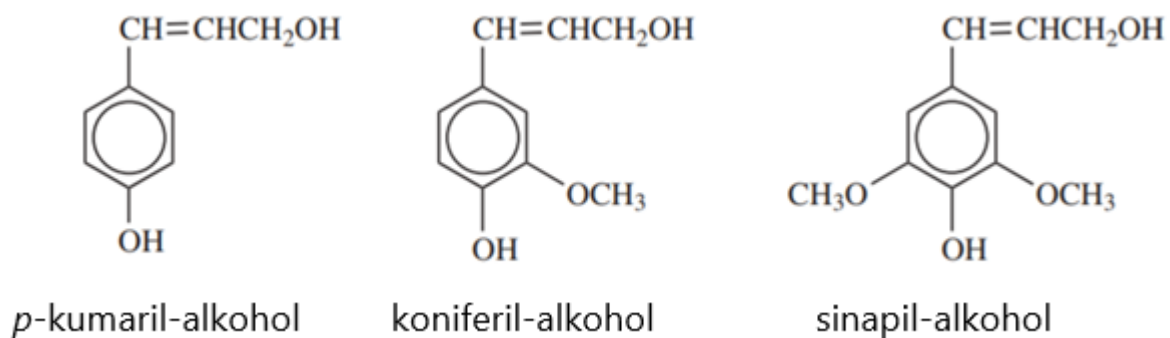
Slika 4. Kemijska struktura ksilana (Mussatto i sur., 2009).

Zbog svoje građe, hemiceluloza nema kristaliničnu, već amorfnu strukturu. U vodi je topljiva pri višim temperaturama, a njezina hidroliza započinje pri manjim temperaturama u odnosu na temperaturu potrebnu za razgradnju celuloze. Također, povećanjem kiselosti uvelike se povećava i topljivost i hidroliza hemiceluloze u vodi. Hemiceluloza tvori vodikove

veze s celulozom i ligninom te se s ligninom povezuje s esterskim i eterskim vezama (Faulon i sur., 1994). Tijekom postupka predobrade lignocelulozne sirovine, prvo dolazi do razgradnje hemiceluloze.

2.1.3. Lignin

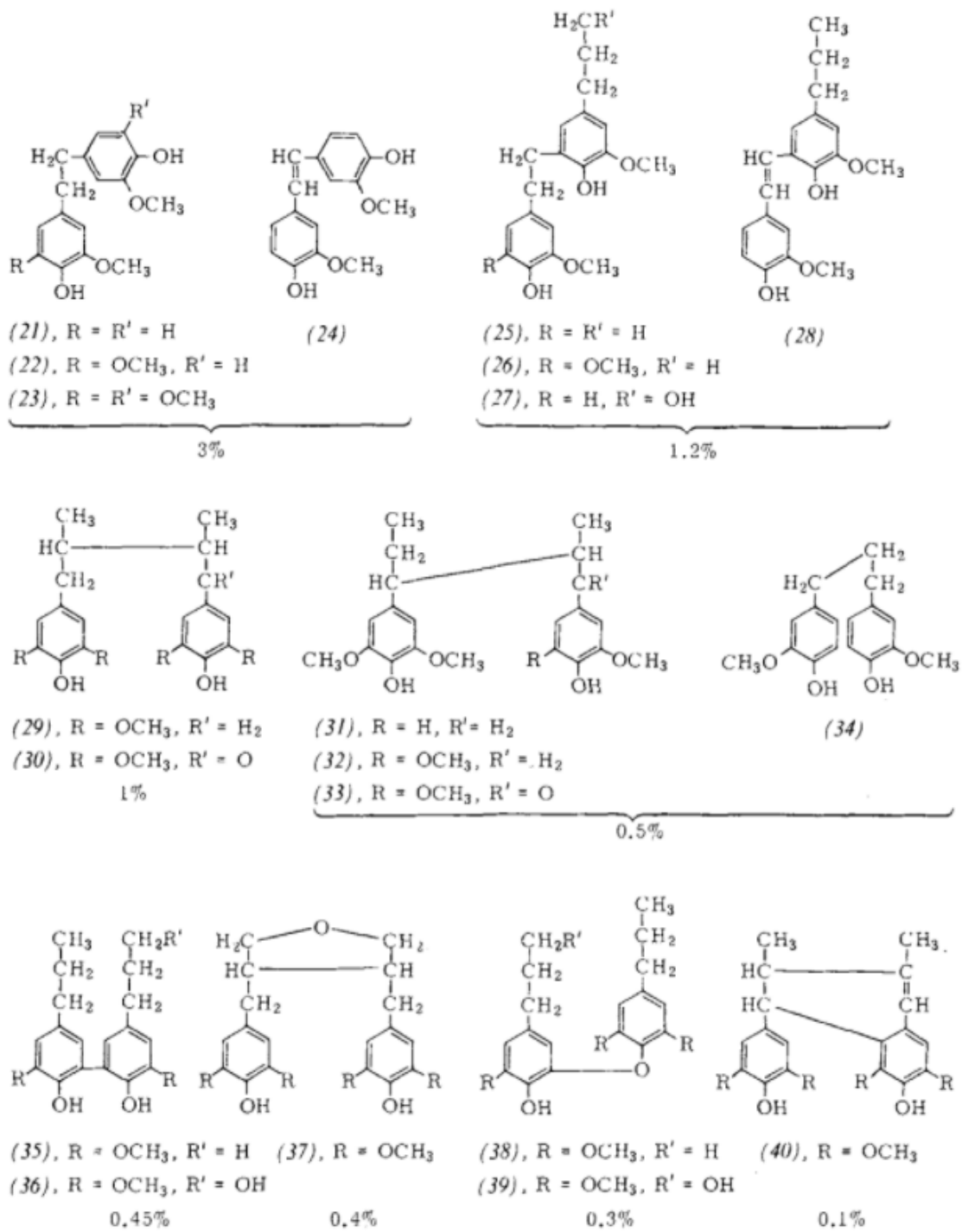
Lignin, kao jedan od građevnih elemenata lignoceluloze, je najzastupljeniji aromatski biopolimer na Zemlji. Ima polimernu trodimenzionalnu amorfnu strukturu, a njegovi glavni građevni elementi su fenilpropanske jedinice. Glavne fenilpropanske jedinice su koniferil-alkohol, *p*-kumaril-alkohol i sinapil-alkohol (Slika 5.), koji su u polimernoj strukturi lignina povezani eterskim vezama te kovalentnim C-C vezama (Harmsen i sur., 2010). Udio lignina u tvrdom drvu manji je nego u mekom. Primjerice, udio lignina u bukvi je 23 % (Da Silva Perez, 2010).



Slika 5. Fenilpropanske gradbene jedinice lignina (Harmsen i sur., 2010).

Lignin je hidrofoban te je zbog toga vrlo važan za transport vode, nutrijenata i metabolita u biljci. Također, lignin biljci daje otpornost na udarce, kompresiju i savijanje (Harmsen i sur., 2010). Netopljiv je u vodi, a topljiv je u niskomolekulskim alkoholima, dioksanu, acetonu, piridinu i dimetil-sulfoksidu. Povećana temperatura i kiseli ili lužnati medij uzrokuju depolimerizaciju lignina (Harmsen i sur., 2010).

Razgradnjom lignina bukve tiooctenom kiselinom te analizom dobivenih produkata, određena je vrsta i udio dilignola koji grade lignin bukve (Slika 6.), određeni su tipovi veza (Tablica 1.) te je u konačnici na temelju tih podataka predložena strukturna formula lignina bukve (Slika 7.; Nimz, 1974).

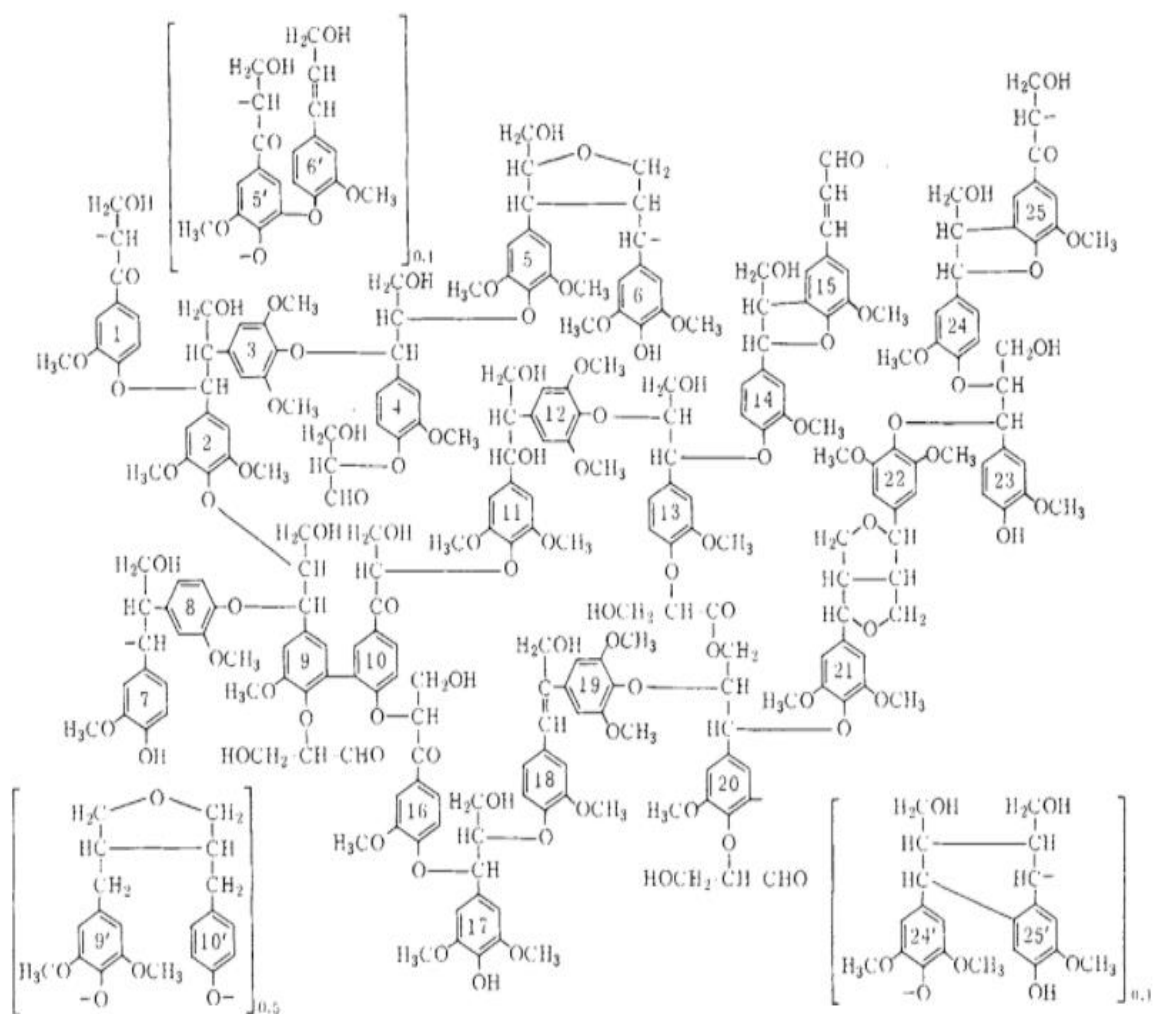


Slika 6. Dilignoli dobiveni razgradnjom lignina bukve tiooctenom kiselinom (Nimz, 1974).

Tablica 1. Udjeli različitih tipova veza u ligninu bukve (Nimz, 1974).

Tip veze	Dilignoli*	Udio [%]
Aciklični α i β eteri	--	65
β -1 veze (1,2-diarilpropanske jedinice)	(21)-(24)	15
β -5 veze (fenilkumaranske jedinice)	(25)-(28)	6
β - β veze (siringarezinol i pinorezinol jedinice)	(29),(30)	5
α - β veze	(31)-(34)	2,5
5-5 veze (bifenilne jedinice)	(35),(36)	2,3
β - β veze u dibenziltetrahidrofuranskim jedinicama	(37)	2
5-O-4 veze (difenileterske jedinice)	(38),(39)	1,5
β - β i α -6 veze (tetralinske jedinice)	(40)	0,5

* Broj označen na Slici 7.



Slika 7. Predložena struktura lignina bukve (Nimz, 1974).

2.2. Tvrdo drvo (bukva) kao biotehnoška sirovina

Potencijalne lignocelulozne sirovine u Republici Hrvatskoj, koje bi se mogle koristiti kao temelj buduće biotehnoške proizvodnje, su otpad koji nastaje od ostataka iz poljoprivrede, šumarstva, prehrambene i drvne industrije. Godišnja količina šumarskog otpada procijenjena je na 0,4 milijuna tona, dok otpad drvno-prerađivačke industrije godišnje iznosi oko 0,3 milijuna tona, što čini ukupno oko 0,7 milijuna tona drvnog otpada koji se danas djelomično koristi u proizvodnji energije za potrebe drvno-prerađivačke industrije, no veći dio trune u šumama ili se odlaže na odlagališta (Strategija gospodarenja otpadom Republike Hrvatske, NN 178/05).

Pilanski ostaci problem su i trošak za pilane (Ištvančić i sur., 2008). Velik broj pilana ima slaba ili nikakva rješenja za pilanski ostatak, tj. za piljevinu, koru, okorke, okrajke i dr. Navedeni ostaci ne nalaze veću primjenu u proizvodnji ploča od usitnjenog drva. Uglavnom se ti ostaci iskorištavaju za proizvodnju toplinske energije, prodaju se stanovništvu za ogrjev i sl. Godišnji pilanski ostatak u obliku kore iznosi 170 000 m³, u obliku piljevine 130 000 m³ te 299 000 m³ u obliku ostalog drvnog ostatka. Također, daljnjom sekundarnom obradom nastaje oko 99 500 m³ piljevine godišnje. Bukva je najmnogodrvnija vrsta u Republici Hrvatskoj, s 36 % udjela, slijedi hrast lužnjak s 12,2 %, hrast kitnjak s 9,7 %, grab s 9,1 %, poljski jasen s 3,2 %, javor, bagrem, pitomi kesten, lipa, joha, vrba i topola s oko 8,5% udjela bjelogoričnih vrsta (listača). Inače su u nas bjelogorične vrste u drvnj zalihama zastupljene s ukupno 87,3 %. Od navedenih bjelogoričnih vrsta, samo lipa spada u meko drvo, a sve ostale su svrstane u tvrdo drvo (Ištvančić i sur., 2008). Obzirom na rasporostranjenost bukve u Hrvatskoj, kao i na njezinu zastupljenost u drvnj industriji te na količinu nastalog otpada, posebno je važno obratiti pozornost na gospodarenje otpadom te istražiti njegov potencijal kao lignocelulozne sirovine za razvoj biotehnoške proizvodnje čiji krajnji produkti postižu višestruko veću cijenu od polazne sirovine.

Bukva je listopadno tvrdo drvo iz roda *Fagus*, koje u glavnom raste na području sjevernog umjerenog pojasa. Najzastupljenija vrsta u Europi pa i u Hrvatskoj je obična bukva (*Fagus sylvatica*). Bukva može narasti do 40 metara visine, dok joj promjer debla može iznositi do 2 metra. Listovi su jednostavni i naizmjenični, dužine 5-12 cm i širine 3-8 cm. Biljka je jednodomna, s muškim i ženskim cvatovima, koji se oprašuju vjetrom, rezultat čega je na kraju plod bukvice (Čavlović i Anić, 2008). Stablo, list i plod obične bukve prikazani su na Slici 8. Prosječne vrijednosti kemijskog sastava kore, bijeli i srži bukovine nalaze se u Tablici 2. Šume

bukve te šume bukve s ostalim drvećem zauzimaju čak 34,9 % površine svih šuma Hrvatske, što iznosi 901484 hektara, a po volumenu zauzima skoro 50 % sveukupnog volumena šuma u Hrvatskoj (Čavlović i sur., 2012). Rasprostranjenost bukove šume po sjemenskim regijama u Hrvatskoj prikazana je na Slici 9.

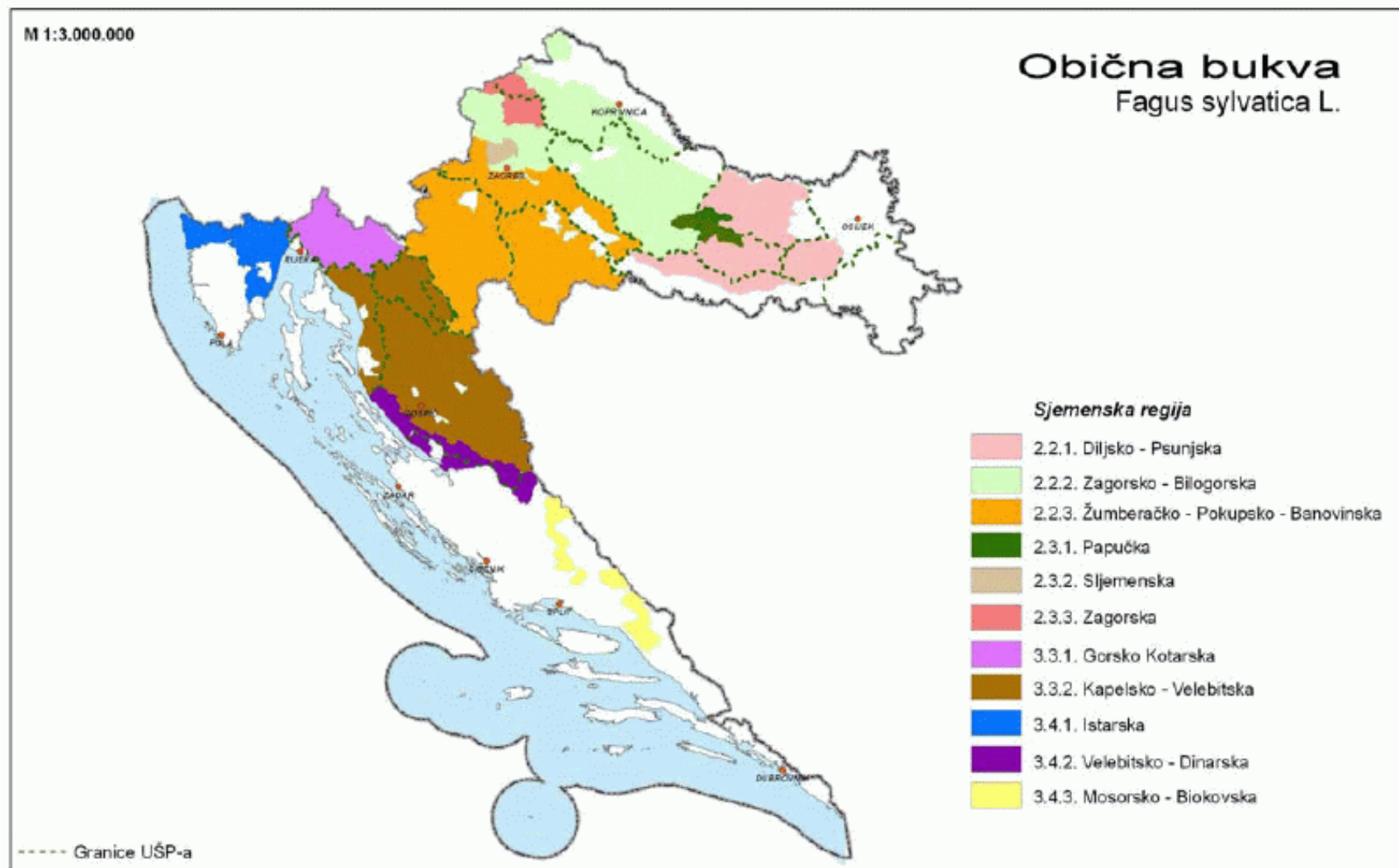


Slika 8. Stablo, list i plod obične bukve (Anonimus, 2020).

Tablica 2. Prosječne vrijednosti kemijskog sastava kore, bijeli i srži bukovine (Antonović i sur., 2007).

Dio drveta	Udio u drvu [%]	Vodeni ekstrakt [%]	MB ekstrakt* [%]	Pepeo [%]	Celuloza [%]	Holoceluloza [%]	Pentozani [%]	Heksozani [%]	Lignin [%]
Kora	10,00	14,00	2,60	5,20	24,10	--	16,40	--	42,90
Bijel	45,00	6,60	0,80	0,40	45,60	77,70	24,65	7,08	22,90
Srž	45,00	7,50	0,80	0,47	45,09	77,75	24,67	6,71	21,75

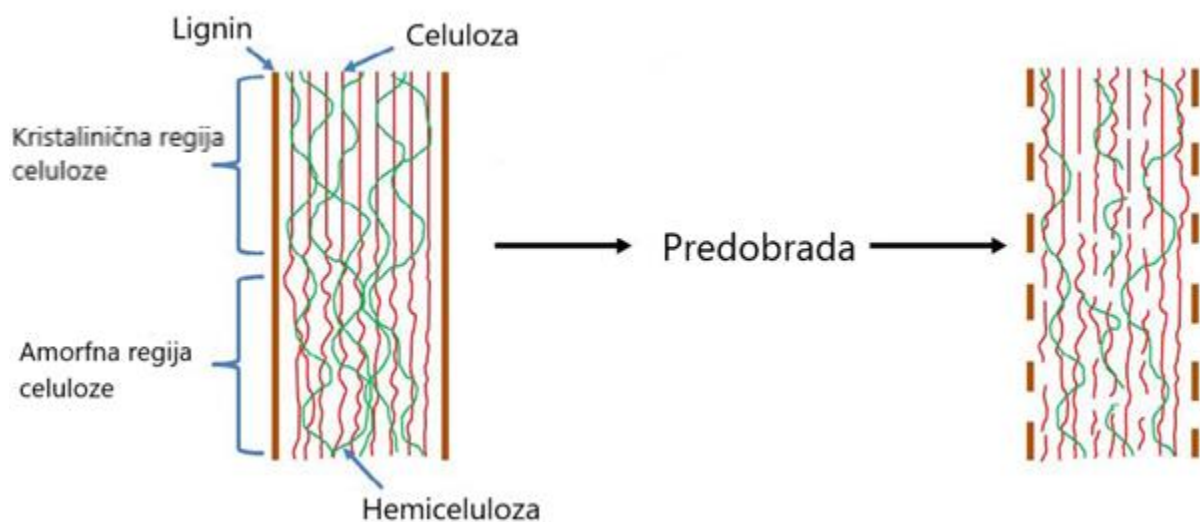
*ekstrakcija smjesom otapala metanol-benzen



Slika 9. Rasprostranjenost obične bukve u Hrvatskoj (Pravilnik o područjima provenijencija svojti šumskog drveća od gospodarskog značaja, NN 107/08).

2.3. Metode predobrade lignoceluloznih sirovina

Kako bi se iz kompleksne lignocelulozne sirovine dobili jednostavniji šećeri, koje će radni mikroorganizmi moći metabolizirati, potrebno je ove sirovine podvrgnuti određenim postupcima predobrade i hidrolize. Tijekom predobrade struktura i kemijski sastav lignoceluloznih sirovina se mijenja. Cilj je postići što veći stupanj hidrolize hemiceluloze, ukloniti lignin te smanjiti kristaliničnost celuloze. Time se povećava poroznost, što rezultira povećanjem aktivne površine celuloze dostupne za kasniju hidrolizu celulazama (Amin i sur., 2017). Također, tijekom predobrade često nastaju neželjeni nusproizvodi koji inhibiraju radni mikroorganizam pa ih je određenim operacijama potrebno ukloniti. Budući da je predobrada tehnološki najzahtjevniji i najskuplji dio procesa biotehnoške proizvodnje iz lignoceluloznih sirovina, rješenje tog problema traži se na mnogo načina. Tako se predobradu može podijeliti na pet osnovnih metoda (fizikalna, kemijska, fizikalno-kemijska, biološka te enzimska), od kojih se svaka može provesti na više načina (Ceballos i sur., 2015). Utjecaj različitih metoda predobrade i promjene lignoceluloze koje se pritom zbivaju prikazane su na Slici 10. i u Tablici 3., a prednosti i nedostaci metoda u Tablici 4.



Slika 10. Shematski prikaz osnovne lignocelulozne makrostrukture prije i nakon predobrade (Ceballos i sur., 2015).

Tablica 2. Učinci različitih metoda predobrade na lignocelulozne sirovine (Toma 's-Pejo' i sur., 2011).

Učinak predobrade Metoda predobrade	Povećanje dostupne površine	Dekristalizacija celuloze	Otapanje hemiceluloze	Uklanjanje lignina	Narušavanje strukture lignina	Nastajanje toksičnih spojeva
Mehaničko usitnjavanje	+++	+++	0	0	0	0
Ekstruzija	+++	+++	0			
Tretman kiselinom	+++	0	+++	++	+++	+++
Tretman lužinom	+++	+++	++/+++	+++	+++	+
Organosolv	++	--	+++	++/+++	++	++/+
Ozonoliza	++	++	++/+++	+++	++	+
Ionske tekućine	++	+++	+++	++/+++	++	++/+
Mokra oksidacija	+++	--	+++	++	+++	++
Mikrovalovi	+++	+++	+	+++	+++	+
Tekuća vruća voda	+++	--	+++	+	++	+
Eksplozija amonijakom	+++	++	++	+	+++	+
Sulfitna predobrada	+++	++	+++	++	++	+
Superkritični fluidi	++/+++	--	++	+++	++	++
Parna eksplozija	+++	--	+++	++	+++	+++
Biološka predobrada	++	0	0	+++		0/+

+++ , jaki učinak; ++, srednji učinak; +, slabi učinak; 0, bez učinka

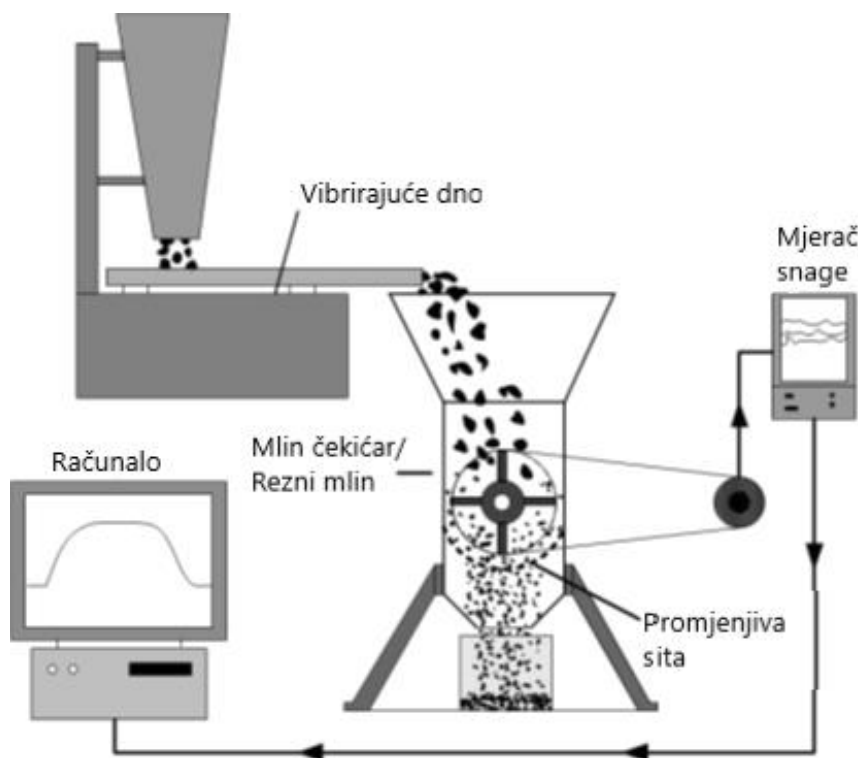
Tablica 3. Prednosti i nedostaci različitih metoda predobrade lignoceluloznih sirovina (Tomaš-Pejić i sur., 2011).

Metoda predobrade	Prednosti	Nedostaci
Mljevenje	Smanjuje kristaliničnost celuloze	Visok utrošak energije
Koncentrirana kiselina	Visok prinos glukoze, provodi se na sobnoj temperaturi	Visoka cijena kiseline te njena regeneracija, izaziva koroziju reaktora, nastajanje inhibitora
Razrijeđena kiselina	Manji problemi s korozijom nego kod koncentrirane, manja formacija inhibitora	Nastanak produkata razgradnje, slaba koncentracija šećera u izlaznom toku
Lužina	Efikasno otapanje lignina i hemiceluloze	Potrebno uklanjanje lužine
Organosolv	Razgradnja lignina, ne nastaju toksični nusprodukti	Visok trošak, otopine treba zbrinuti i reciklirati
Ozonoliza	Hidroliza lignina i hemiceluloze	Visoki troškovi zbog potrebne količine ozona
Mokra oksidacija	Efikasno uklanjanje lignina, malo nastajanje inhibitora, smanjenje utroška energije zbog egzotermnosti reakcije	Velika potrošnja kisika i lužnatog katalizatora
Tekuća vruća voda	Nije potreban katalizator, niska cijena reaktora	Velika potreba za vodom i energijom, mali udio suhe tvari tvari tijekom predobrade
Eksplozija amonijakom	Povećanje dostupne površine, malo nastajanje inhibitora	Veliki utrošak amonijaka, neefikasno za sirovine bogate ligninom
Parna eksplozija	Razgradnja lignina i otapanje hemiceluloze, visoki prinosi celuloze i hemiceluloze, financijski isplativo	Nastanak toksičnih spojeva, djelomična razgradnja hemiceluloze
Eksplozija sa CO ₂	Povećanje dostupne površine, ne nastaju toksični spojevi, financijski isplativo	Ne djeluje na lignin i hemicelulozu, potrebni vrlo visoki tlakovi
Biološka	Razgradnja lignina i hemiceluloze, nizak utrošak energije	Potrebna pažljiva kontrola uvjeta procesa, dugo vrijeme oksidacije

2.3.1. Predobrada tvrdog drveta

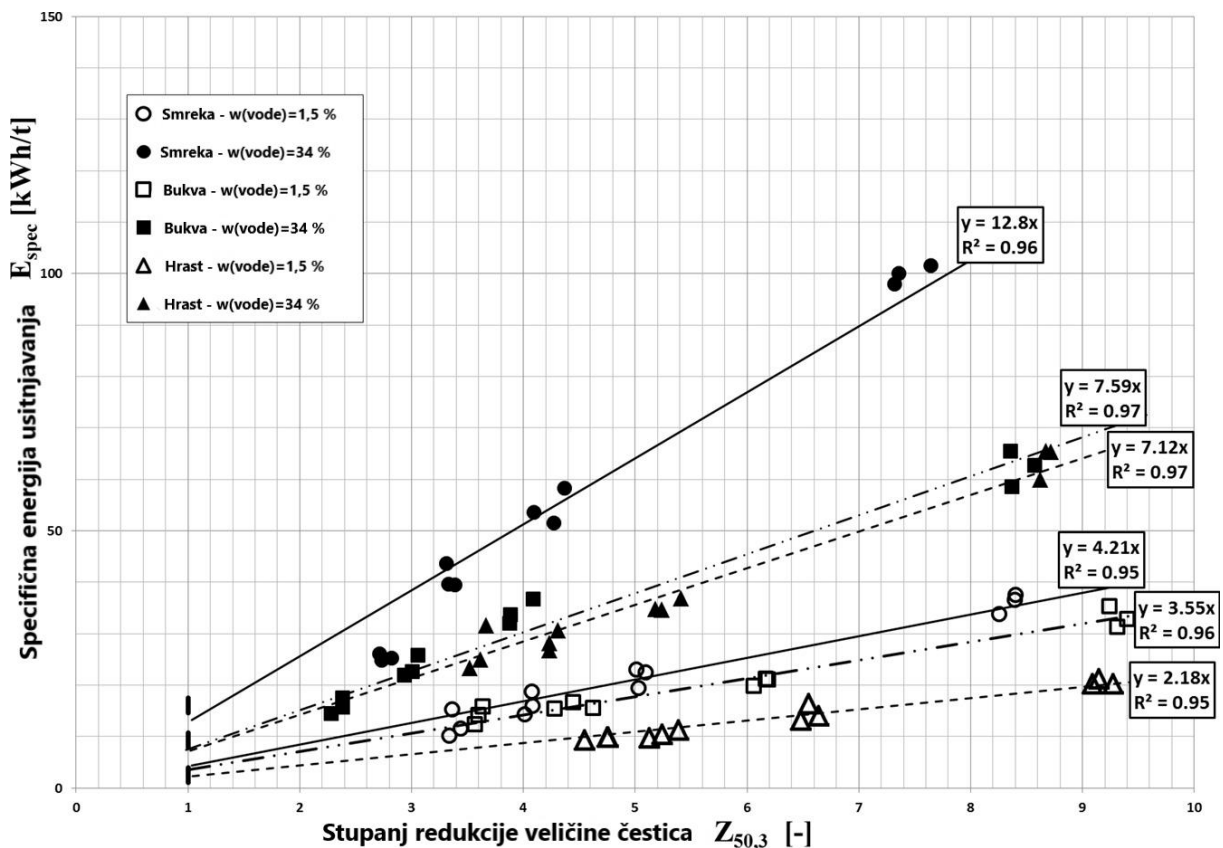
Smanjenje dimenzija tvrdog drveta kao lignocelulozne sirovine gotovo je uvijek tzv. nulti korak u predobradi ukoliko se ne kreće od otpada drvene industrije (npr. bukova piljevina), već od trupaca ili granja. Naime, veličina čestica uvelike utječe na prijenos mase i topline, a time i na efikasnost sljedećeg koraka predobrade, odnosno na iskorištenje sirovine. Usitnjavanje samo po sebi nije dovoljno da bi se ispunili svi kriteriji predobrade, osobito po pitanju delignifikacije, te je potrebno primijeniti metode kojima se postižu zadovoljavajući rezultati, kao što su termokemijska i biološka predobrada. Nadalje, usitnjavanje je energetski zahtjevan proces, zbog čega utječe na cijenu i konkurentnost konačnog proizvoda. Stoga je potrebno odrediti maksimalnu veličinu čestica (ona ispod koje ne dolazi do porasta efikasnosti predobrade). Za tvrdo drvo maksimalna veličina čestica (debljina čipsa) iznosi 2,54 mm (Vidal i sur., 2011). Naravno, rezultat i efikasnost usitnjavanja ovise i o vrsti sirovine te korištenoj procesnoj opremi.

Eisenlauer i Teipel (2020) proveli su usitnjavanje čipsa dvije vrste tvrdog drveta (bukve i hrasta) te jedne vrste mekog drveta (smreke) u reznom mlinu i mlinu čekićaru pri različitim masenim udjelima vode u sirovini. Shema aparature prikazana je na Slici 11.

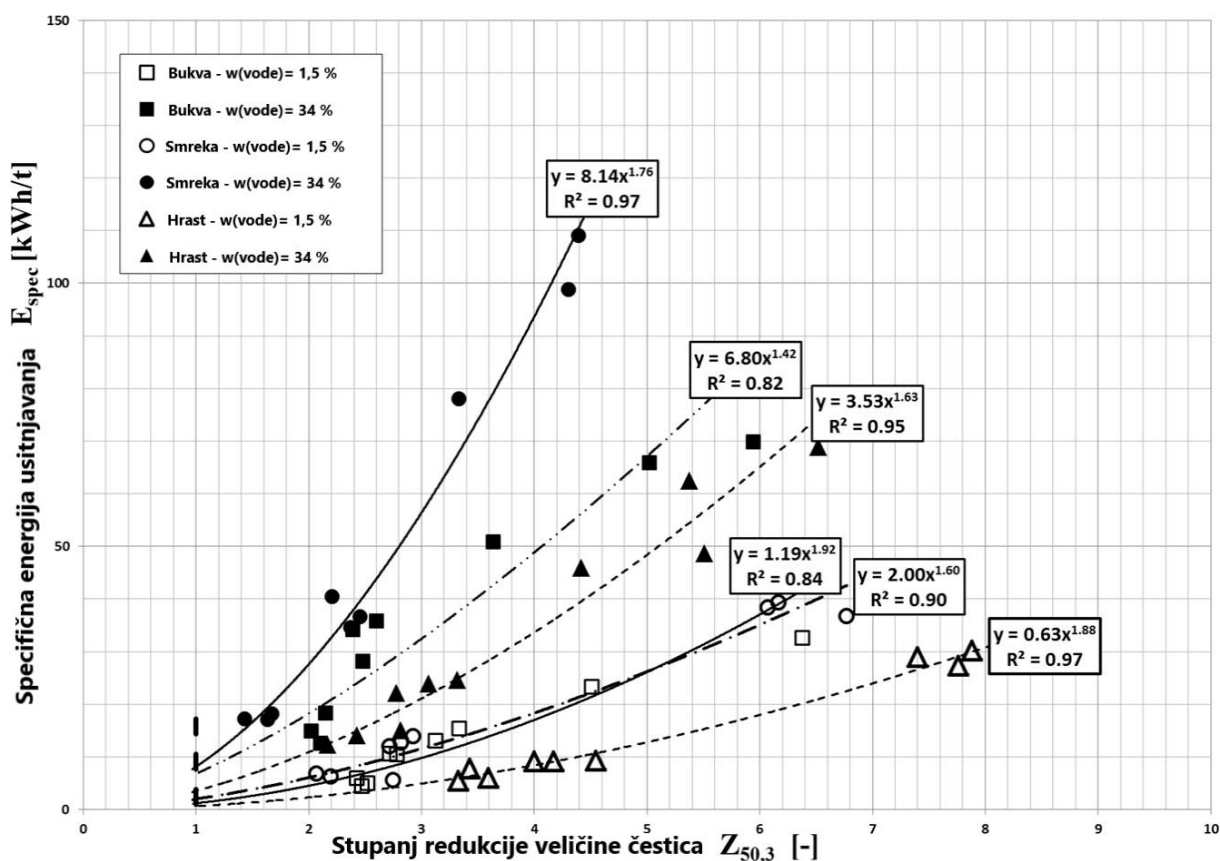


Slika 11. Shematski prikaz aparature za provođenje eksperimenta (Eisenlauer i Teipel, 2020).

Uspoređujući rezultate za različite udjele vode (34 % i 1,5 %) vidljivo je da se pri usitnjavanju drveta koje sadrži manji udio vode u obje vrste mlina dobiju finije čestice manjeg promjera. Stupanj disperzije veći je pri svim parametrima za mlin čekićar, odnosno mlin čekićar daje širu raspodjelu veličine čestica. Rezni mlin generalno daje čestice manjih promjera od mlina čekićara, no to, obzirom na ostala istraživanja, može biti u korelaciji sa samim dizajnom mlina. Stupanj disperzije obzirom na udio vode u sirovini za mlin čekićar raste s porastom udjela suhe tvari, dok je kod reznog mlina uočen suprotan efekt. Ovisnost specifične energije potrebne za usitnjavanje (E_{spec}) o stupnju redukcije veličine čestica ($Z_{50,3}$) najvažniji je istraživani faktor, budući da izravno utječe na ekonomičnost procesa usitnjavanja pa tako i konačnog proizvoda. Odnos specifične energije potrebne za usitnjavanje i stupnja smanjivanja veličine čestica za rezni mlin je linearan s pozitivnim nagibom (Slika 12.), dok je za mlin čekićar utvrđena eksponencijalna ovisnost s pozitivnim eksponentom (Slika 13.). Pri većim udjelima vlage te porastom stupnja smanjenja čestica, veća je potrošnja energije potrebne za usitnjavanje. Pokazalo se da ekonomika procesa posredno ovisi o udjelu vode u sirovini, odnosno da je ekonomičnije usitnjavati sirovine s manje vode, tj. da sušenje ovih sirovina prije usitnjavanja smanjuje potrebu za energijom.



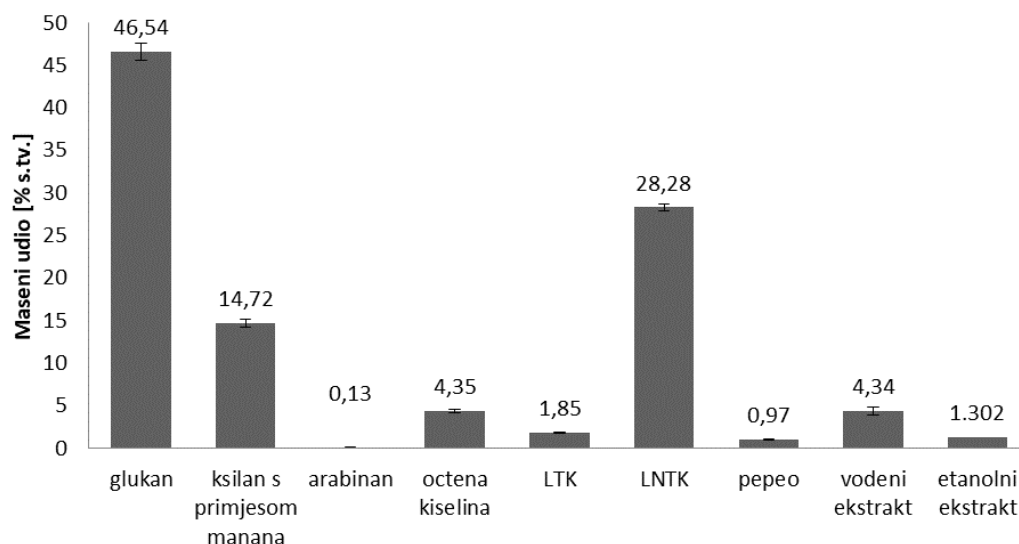
Slika 12. Ovisnost specifične energije potrebne za usitnjavanje (E_{spec}) o stupnju redukcije veličine čestica ($Z_{50,3}$) za rezni mlin (Eisenlauer i Teipel, 2020).



Slika 13. Ovisnost specifične energije potrebne za usitnjavanje (E_{spec}) o stupnju redukcije veličine čestica ($Z_{50,3}$) za mlin čekičar (Eisenlauer i Teipel, 2020).

Ilić (2019) je proveo jednostupanjsku predobradu čipsa bukve razrijeđenom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru. Korišteni čips bukve s područja sjeverozapadne Hrvatske bio je prosječne debljine $0,59 \pm 0,189$ cm i sadržavao je 93,52 % suhe tvari, a kemijski sastav ove sirovine prikazan je na Slici 14. Koncentracija sumporne kiseline bila je 0,5 % (w/v), a eksperiment je vođen pri različitim temperaturama (160 °C, 180 °C i 200°C) i vremenima zadržavanja (5, 10, 15 i 20 min) kako bi se optimirali uvjeti za proizvodnju lignoceluloznog hidrolizata, tj. za oslobađanje što veće koncentracije monosaharida, uz prihvatljivu koncentraciju inhibitora u tekućoj fazi. Pri temperaturi 180 °C i vremenu zadržavanja 10 minuta zapaženi su najbolji rezultati (Tablica 5). Najveća razgradnja glukoze obzirom na njenu koncentraciju u tekućoj fazi (4,05 g/L) zapažena je nakon tretmana provedenog pri temperaturi 200 °C uz vrijeme zadržavanja 10 minuta. Koncentracija arabinoze je u svim hidrolizatima bila znatno manja od koncentracija ostalih monosaharida. Uočeno je da pri višim temperaturama i duljim vremenima zadržavanja nastaje veća količina inhibitora (mravlja kiselina, octena kiselina, levulinska kiselina, furani i lignin topljiv u kiselini). Napravljena je analiza i sastava čvrste faze koja zaostaje nakon različitih uvjeta predobrade, a rezultati su prikazani u Tablici

6. Zbog nemogućnosti razdvajanja ksiloze, galaktoze i manoze na korištenoj analitičkoj koloni, navedeno je izraženo kao ksiloza s primjesama manoze i galaktoze. Autor stoga predlaže nastavak istraživanja s odgovarajućom analitičkom kolonom radi točnijeg određivanja sastava polisaharida u čipsu bukve te tekućoj i čvrstoj fazi dobivenoj predobradom sirovine.



Slika 14. Kemijski sastav suhe tvari čipsa bukve koji sadrži $93,52\% \pm 0,051$ suhe tvari (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija; LTK – lignin topljiv u kiselini, LNTK – lignin netopljiv u kiselini) (Ilić, 2019).

Tablica 5. Sastav hidrolizata dobivenog jednostupanjskom predobradom čipsa bukve razrijeđenom kiselinom (sumporna kiselina koncentracije 0,5 % w/v, 180 °C/10 min) (Ilić, 2019).

Komponenta tekuće faze	Koncentracija
Ksiloza s primjesama manana i galaktana	[10,88 g/L]
Glukoza	[2,16 g/L]
Arabinoza	[0,49 g/L]
Mravlja kiselina	[0,14 g/L]
Octena kiselina	[2,51 g/L]
Furan	[255,61 mg/L]
Lignin topljiv u kiselini	[4,32 %]

* pri navedenim uvjetima predobrade levulinska kiselina nije detektirana

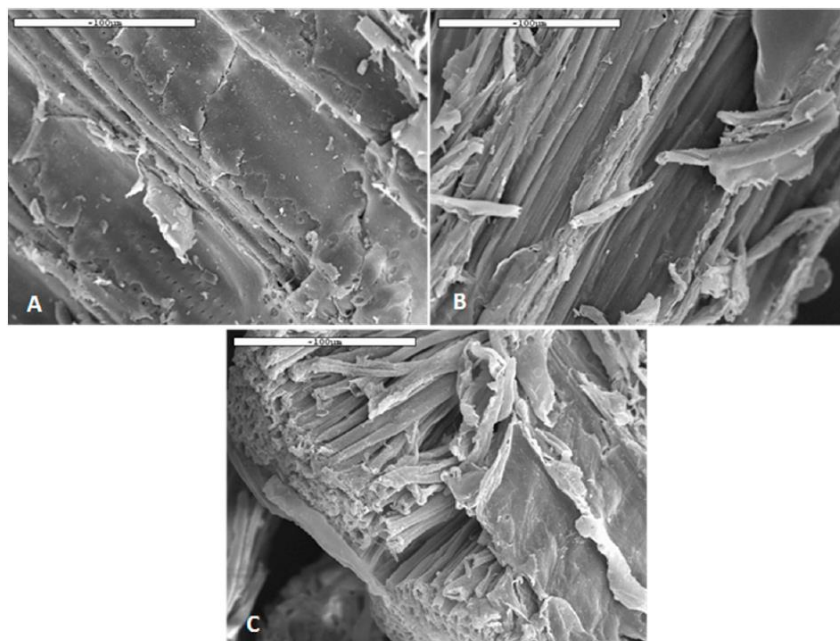
Tablica 6 Sastav čvrste faze dobivene jednostupanjskom predobradom čipsa bukve razrijeđenom sumpornom kiselinom (0,5 % w/v), pri temperaturama 160 °C - 200°C i vremenima zadržavanja 5 - 20 minuta (Ilić, 2019).

Komponenta čvrste faze	Maseni udio [% w/w]
Glukan	37,2 – 62,79
Ksilan s primjesama manana i galaktana	2,45 – 4,81
Netopljivi lignin	27,28 – 34,94
Octena kiselina	5,37 - 23,21

Kalogiannis i sur. (2018) proveli su predobradu piljevine bukve (*Fagus sylvatica*) „organosolv“ metodom potpomognutu dodatkom anorganske kiseline. Maseni udio pojedinih komponenata u suhoj tvari bukove piljevine iznosio je 43,1 % celuloze, 20,2 % hemiceluloze i 24,2 % lignina te 9,1 % ekstraktivnih spojeva. Korištena organska otapala koja se miješaju s vodom bili su etanol i aceton, dok je metil-izobutil-keton korišten kao organsko otapalo koje se ne miješa s vodom. Anorganske kiseline, korištene za pospješivanje predobrade „organosolv“ metodom bile su sumporna, fosforna i oksalna. Uvjeti predobrade bili su 175 °C/1 h. Kao najbolji početni uvjeti predobrade pokazala se primjena 60 %-tnog (v/v) acetona sa sumpornom kiselinom (1 % w/w na masu suhe tvari sirovine) i 60 %-tni (v/v) etanol s fosfatnom kiselinom (5,6 % w/w na masu suhe tvari sirovine). Rezultati predobrade prikazani su u Tablici 7. Zapažen je vrlo velik stupanj delignifikacije, veliko iskorištenje celuloze te vrlo dobra saharifikacija. U slučajevima kad je čvrsta faza nakon predobrade sadržavala veće udjele celuloze, hidroliza celuloze u glukozu bila je efikasnija. Indeks kristaliničnosti celuloze ostao je nakon predobrade relativno visok, a autori to objašnjavaju kao posljedicu velikog iskorištenja celuloze u čvrstoj fazi. Specifična površina sirovine iznosila je 0,27 m²/g te se povećala nakon predobrade (Tablica 7.). Promjene strukture bukove piljevine do kojih je došlo tijekom predobrade prikazane su na Slici 15. Čvrste faze su nakon predobrade podvrgnute tzv. „High gravity“ simultanoj saharifikaciji komercijalnim enzimima i alkoholnoj fermentaciji s pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (soj Ethanol Red®, Fermentis Marcq-en-Baroel, Francuska). U navedenim optimalnim uvjetima dobiveni su vrlo veliki prinosi proizvedenog etanola čije su masene koncentracije iznosile 76,3 g/L (predobrada provedena kombinacijom acetona i sumporne kiseline) odnosno 80 g/L (predobrada provedena kombinacijom etanola i fosfatne kiseline).

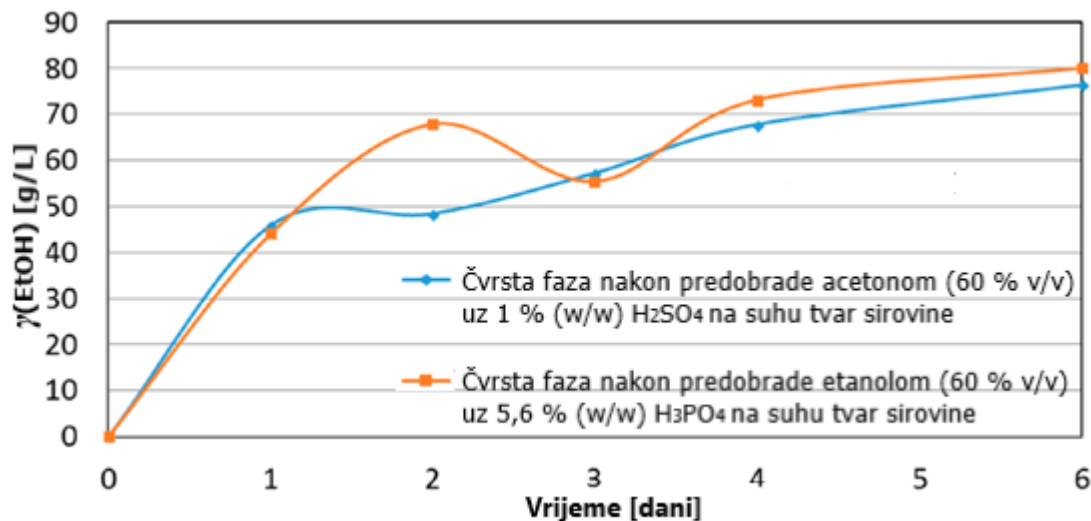
Tablica 7. Rezultati dobiveni uz optimalne uvjete predobrade bukove piljevine (Kalogiannis i sur., 2018).

Učinak predobrade \ Optimalni uvjeti predobrade	Aceton 60 % (v/v) uz 1 % (w/w) H ₂ SO ₄ na suhu tvar sirovine	Etanol 60 % (v/v) uz 5,6 % (w/w)H ₃ PO ₄ na suhu tvar sirovine
Celuloza u čvrstoj fazi [% w/w]	89,7	85,1
Hemiceluloza u čvrstoj fazi [% w/w]	6,3	10,0
Lignin u čvrstoj fazi [% w/w]	4,2	4,6
Iskorištenje celuloze [%]	91,7	93,6
Iskorištenje hemiceluloze [%]	13,6	23,3
Iskorištenje lignina [%]	7,6	9,1
Indeks kristaliničnosti celuloze [%]	78,1	77,3
Specifična površina [m²/g]	1,18	1,08



Slika 15. Slike dobivene skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM): a) Netretirana sirovina, b) Sirovina tretirana acetonom (60 % v/v) uz 1 % (w/w) H₂SO₄ na suhu tvar sirovine, c) Sirovina tretirana etanolom (60 % v/v) uz 5,6 % (w/w) H₃PO₄ na suhu tvar sirovine (Kalogiannis i sur., 2018).

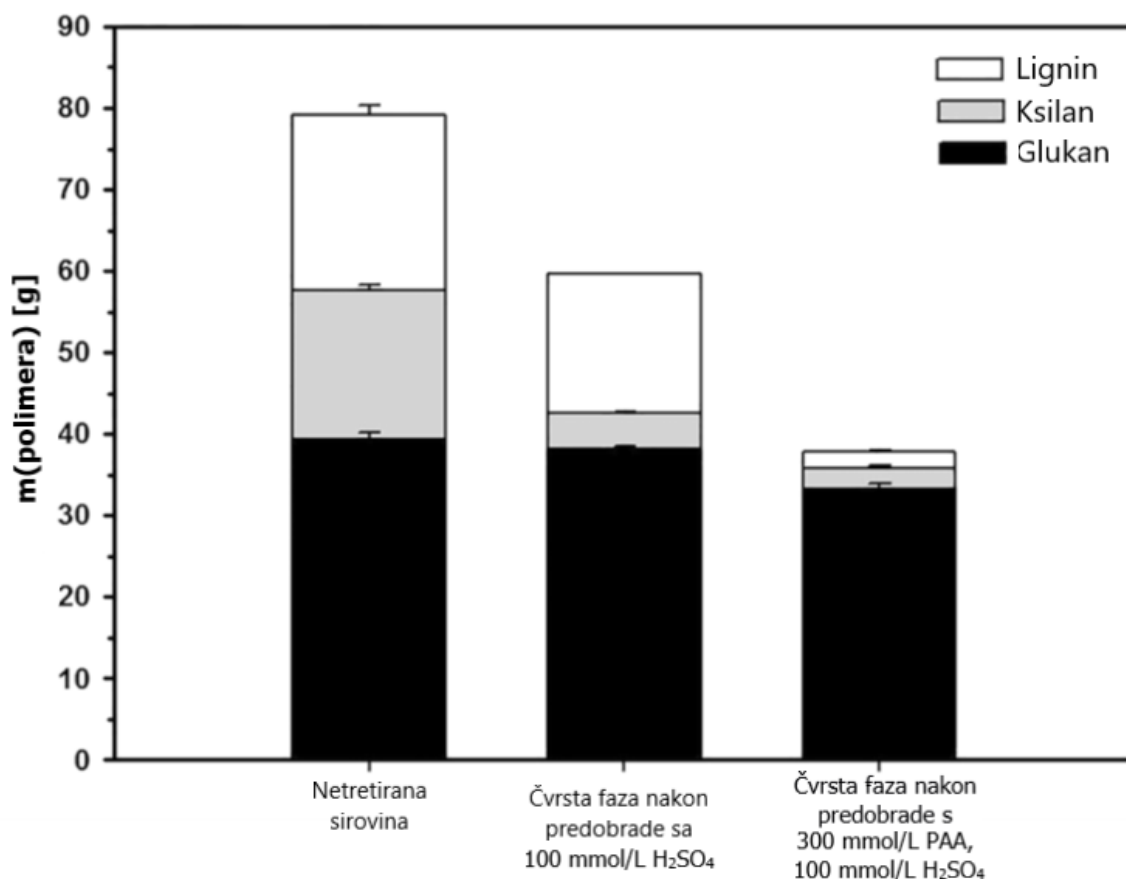
U radu Kalogiannis i sur. (2018) provedena je simultana saharifikacija i fermentacija komercijalno dostupne bukove piljevine (Slika 16.). Bukova piljevina prije bioprocasa podvrgnuta je organsolv predobradi sa 60 %-tnim (v/v) acetonom i sumpornom kiselinom te etanolom i fosfornom kiselinom. Za navedene dvije kombinacije najboljih uvjeta koncentracija proizvedenog etanola od 40 g/L postignuta je nakon manje od 24 h od početka procesa simultane saharifikacije i fermentacije.



Slika 16. Promjena koncentracije etanola tijekom simultane saharifikacije i fermentacije (SSF) s pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (soj Ethanol Red®, Fermentis Marcq-en-Barœl, Francuska). Trajanje predsaharifikacije je 8 h (Kalogiannis i sur., 2018).

Lee i sur. (2017) proveli su jednostupanjsku predobradu tvrdog drveta s dodatkom peroctene kiseline (engl. peracetic acid, PAA), kao jakog oksidansa. Svrha je bila optimizacija jednostupanjske predobrade sa sumpornom kiselinom, tj. što bolje uklanjanje lignina i hemiceluloze uz što manji gubitak celuloze, odnosno glukana, iz čvrstog dijela. Također, bio je naglasak i na smanjenje utroška energije tijekom predobrade. Kao sirovina je korištena 20 godina stara žuta topola (*Liriodendron tulipifera*) s područja Južne Koreje, bez kore, granja i lišća. Trupci su usitnjeni do čestica koje su prošle kroz sito promjera pora 0,25-0,42 mm. Zatim je usitnjena masa osušena pri temperaturi od 50 °C te ostavljena na sobnoj temperaturi do upotrebe. Nakon predobrade analizirani su utjecaji različitih koncentracija peroctene kiseline, temperatura, koncentracija sumporne kiseline te vremena. Važno je naglasiti i činjenicu da su u istraživanim uvjetima predobrade nastale zanemarive koncentracije furfurala i hidrosimetilfurfurala. Ovi spojevi često nastaju razgradnjom šećera pri žestokim uvjetima predobrade lignoceluloznih sirovina i mogu inhibirati kasniju fermentaciju. Odabrani su

optimalni uvjeti u kojima su gubitak glukana i nastajanje nusproizvoda bili minimalni, a istodobno je bilo jače uklanjanje ksilana i lignina. To je postignuto pri 120 °C/5 minuta uz dvije kombinacije parametara: primjenom 300 mmol/L peroctene kiseline (2.3 % w/w), odnosno 100 mmol/L sumporne kiseline (1 % w/w). Navedeni optimalni uvjeti blaži su od onih koji se obično koriste za kiselinsku hidrolizu biomase (sumporna kiselina 4 % w/w, pri 120 °/1 sat). Slika 17. prikazuje usporedbu sastava čvrste faze nakon predobrade razrijeđenom sumpornom kiselinom (100 mmol/L H₂SO₄/120 °C/ 5 min) te kombinacijom peroctene i rezrijeđene sumporne kiseline (300 mmol/L PAA, 100 mmol/L H₂SO₄, 120 °C, 5 min). Rezultati ove predobrade prikazani su u Tablici 8.



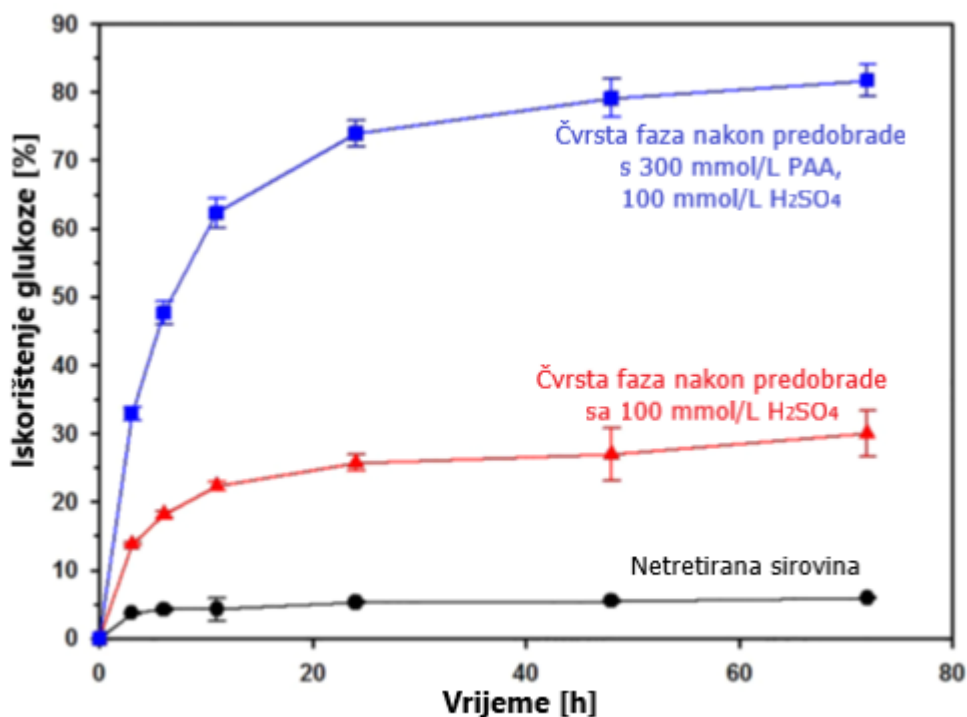
Slika 17. Promjena sastava polimera tijekom obrade tvari žute topole te čvrste faze nakon predobrade razrijeđenom sumpornom kiselinom (100 mmol/L H₂SO₄) te kombinacijom peroctene i rezrijeđene sumporne kiseline (300 mmol/L PAA, 100 mmol/L H₂SO₄). Masa polimera na ordinati odnosi se na masu glukana, ksilana i lignina u 100 g s. tv. početne sirovine, odnosno u suhoj tvari čvrste faze dobivenoj obradom 100 g s. tv. sirovine (Lee i sur., 2017).

Tablica 8. Usporedba rezultata predobrade pri 120 °C/5 min) razrijeđenom sumpornom kiselinom (100 mmol/L H₂SO₄) te kombinacijom peroctene i razrijeđene sumporne kiseline (300 mmol/L PAA, 100 mmol/L H₂SO₄) (Lee i sur., 2017).

Uvjeti predobrade	100 mmol/L H₂SO₄	300 mmol/L PAA + 100 mmol/L H₂SO₄
Učinak predobrade		
Ksilan u čvrstoj frakciji [g/100 g sirovine]	4,4	2,6
Lignin u čvrstoj frakciji [g/100 g sirovine]	17,0	2,1
Glukan u čvrstoj frakciji [g/100 g sirovine]	38,2	33,2
Uklanjanje ksilana [% od mase ksilana u sirovini]	75,8	85,7
Uklanjanje lignina [% od mase lignina u sirovini]	20,8	90,4
Gubitak glukana [% od mase glukana u sirovini]	2,8*	15,4

* Izračunato iz podataka u radu

Iz rezultata prikazanih na Slici 18. i u Tablici 8. vidljivo je da je predobrada dodatkom peroctene kiseline uspješnija u uklanjanju ksilana i lignina. Uspješnije uklanjanje lignina kasnije je pogodovalo i uspješnijoj enzimskoj hidrolizi. Naime, preostali lignin ometa enzimsku hidrolizu na dva načina - blokira pristup enzimima do celuloze i adsorbira enzime. Hidroliza je provedena primjenom komercijalnih celulaza tijekom 72 h. Konverzija glukana u glukozu za proces predobrade razrijeđenom sumpornom kiselinom iznosila je 30,0 %, dok je kombinacijom razrijeđene sulfatne i peroctene kiseline konverzija povećana na 81,7 %, što znači da je dodatak peroctene kiseline u predobradi povećao enzimsku razgradnju 2,5 puta. Rezultati enzimske hidrolize prikazani su na Slici 18. Nedostatak ove metode je gubitak ksiloze i arabinoze, koje mogu fermentirati određeni radni mikroorganizmi s potencijalnom primjenom za fermentaciju lignoceluloznih hidrolizata.



Slika 18. Dijagram enzimske hidrolize glukana u žutoj topoli i čvrstom ostatku nakon predobrade (iskorištenje glukoze izračunato je na glukana u uzorku podvrgnutom enzimskoj hidrolizi) (Lee i sur., 2017).

Mohsenzadeh i sur. (2012) proveli su predobradu tvrdog drveta (breza) i mekog drveta (smreka) natrijevom lužinom uz dodatak nekih drugih kemijskih spojeva (NaOH/tiourea, NaOH/urea, NaOH/urea/tiourea, and NaOH/polietilen-glikol) kako bi se povećala uspješnost procesa proizvodnje bioetanol i bioplina. Breza (*Betula pendula*), bez kore i usitnjena na čestice veličine 75 – 500 μm , korištena je u ovom radu kao primjer tvrdog drveta. Pored usporedbe kombinacija različitih kemikalija, istraživana je i utjecaj različitih temperatura (-15 °C, 0 °C, 22 °C i 80 °C) na efikasnost procesa. Mehanizam ove metode predobrade je takav da natrijeva lužina ulazi u amorfne dijelove celuloze te uzrokuje njeno bubrenje ili čak otapanje, a pritom se smanjuje kristaliničnost celuloze. Tiourea, urea i polietilen-glikol (PEG) vežu vodu te sprječavaju nastajanje vodikovih veza između lanaca celuloze. Pokazalo se da dodani spojevi (tiourea, urea, urea, polietilen-glikol) pospješuje djelovanje NaOH na lignocelulozu. U ovom istraživanju, najbolje rezultate predobrade dala je kombinacija 7 % (w/w) NaOH i 5,5 % (w/w) tiourea pri temperaturi od -15 °C. Usporedba karakteristika netretirane breze i čvrste faze nakon predobrade prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Usporedba netretirane sirovine i čvrste faze nakon predobrade u optimalnim uvjetima (7 % w/w NaOH i 5,5 % w/w tiourea pri -15 °C) (Mohsenzadeh i sur., 2012).

	Netretirana breza	Breza nakon predobrade (čvrsta faza)
Lignin netopljiv u kiselini (AIL) [% w/w u s.tv.]	21,9	27,3
Lignin topljiv u kiselini (ASL) [% w/w u s.tv.]	2,7	5,8
Maseni udio celuloze [% w/w u s.tv.]	40,0	37,5
Indeks kristaliničnosti celuloze *	0,56	0,54
Iskorištenje celuloze u čvrstoj fazi [%]	-	63,8
Uklonjeni lignin iz čvrste faze [% w/w od s.tv.]	-	17,4

* Indeks kristaliničnosti celuloze određen je na temelju FTIR spektroskopije. Apsorpcijske vrpce pri 1427 i 898 cm^{-1} pripisuju se kristalnoj celulozi I, odnosno celulozi II. "Indeks kristaliničnosti izračunat je kao omjer intenziteta apsorpcije A_{1427} / A_{898} .

Maseni udio lignina netopljivog u kiselini (AIL) u suhoj tvari čvrste faze nakon predobrade pri navedenim uvjetima se povećao, isto kao i maseni udio lignina topljivog u kiselini, dok se maseni udio celuloze smanjio. Uočeno je da se maseni udio lignina povećava primjenom manjih temperatura predobrade. Iskorištenje celuloze definirano je kao omjer razlike između mase celuloze prije i nakon predobrade i mase celuloze u početnoj lignoceluloznoj sirovini. Nakon predobrade (NaOH/tiourea, -15 °C) iskorištenje celuloze bilo je 63,8 %, a 17,4 % lignina je uklonjeno. Povećanjem temperature predobrade povećavalo se i iskorištenje celuloze. Indeks kristaliničnosti celuloze se smanjio.

Sirovina je nakon predobrade podvrgnuta enzimskoj hidrolizi primjenom komercijalnih celulaza (Mohsenzadeh i sur., 2012). Najbolje iskorištenje saharifikacije predobrađene breze, koje je iznosilo 83 % od teorijskog iskorištenja, dobiveno je kombinacijom 7 % (w/w) NaOH / 5,5 % (w/w) tiourea pri -15 °C. Stoga je uzorak tog enzimskog hidrolizata korišten za alkoholnu fermentaciju, pri čemu je radni mikroorganizam bio flokulentni soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* CCUG 53 310. Dobiveno je iskorištenje 80,9 % od teorijskog, dok je bioproces proizvodnje etanola proveden na netretiranoj sirovini imao iskorištenje od 12,9 % od teorijskog. Autori napominju da uklanjanje lignina nije na najvišoj razini za predobradu s NaOH/tiouream

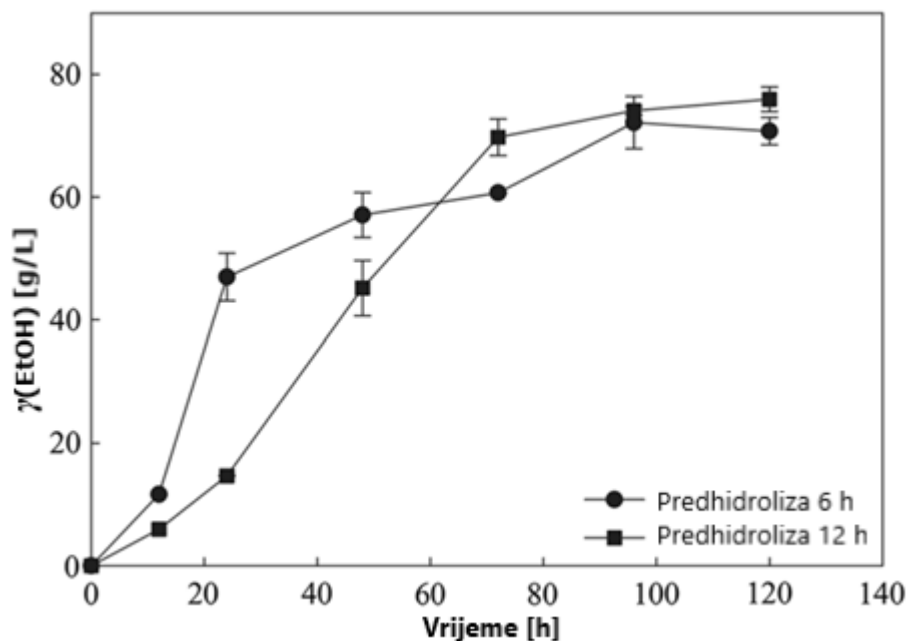
pri -15 ° C, no pri tim uvjetima postignuta je najveća učinkovitost enzimske hidrolize ovako predobrađene sirovine.

Mokra oksidacija biomase, koja koristi vruću vodu, lužine i kisik, smatra se zanimljivom metodom predobrade jer u usporedbi s parnom eksplozijom nastaje puno manje inhibitora poput furfurala i hidrokсимetilfurfurala. U novije vrijeme je kao modifikacija mokre oksidacije razvijen postupak oksidacije aceton/voda (engl. acetone/water oxidation, AWO), u kojem se umjesto vode koristi smjesa aceton/voda, bez upotrebe lužine. Smatra se da AWO kombinira prednosti mokre oksidacije poput male temperature i malo razgradnih produkata dok se istodobno postiže puno bolja delignifikacija biomase u jednostupanjskom procesu. Primjenu ove metode objavili su Katsimpouras i sur. (2017) za predobradu bukve (*Fagus sylvatica*) mokrom oksidacijom uz dodatak acetona, vode i kisika. Veličina čestica bukve bila je 150 – 500 μm . Kemijski sastav suhe tvari sirovine, izražen kao maseni udio, bio je 43,1 % celuloze, 20,2 % hemiceluloze, 21,5 % lignina netopljivog u kiselini (engl. acid insoluble lignin, AIL), 2,7 % lignina topljivog u kiselini (engl. acid soluble lignin, ASL) te 24,2 % ukupnog lignina i 11,23 % ekstraktivnih tvari. Promatran je učinak masenog omjera aceton:voda, tlaka, temperature i vremena predobrade na uspješnost same predobrade te na kasniju saharifikaciju i fermentaciju. Najbolji rezultati (prikazani u Tablici 10.) dobiveni su za sljedeće uvjete predobrade: aceton/voda= 1:1 (w/w), početni tlak (pri 20 °C) 40 atm s 40 % (v/v) kisika, tlak tijekom reakcije 64 atm uz parcijalni tlak kisika od 25,6 atm, temperatura od 175 °C te vrijeme predobrade 2 h. Pri tim uvjetima postignuto je vrlo dobro uklanjanje lignina i hidroliza hemiceluloze.

Tablica 10. Sastav čvrste faze i učinci predobrade bukve mokrom oksidacijom uz dodatak acetona, vode i kisika pri optimalnim uvjetima: aceton/voda= 1:1 (w/w), početni tlak (pri 20 °C) 40 atm s 40 % (v/v) kisika, tlak tijekom reakcije 64 atm uz parcijalni tlak kisika 25,6 atm, 175 °C / 2 h) (Katsimpouras i sur., 2017).

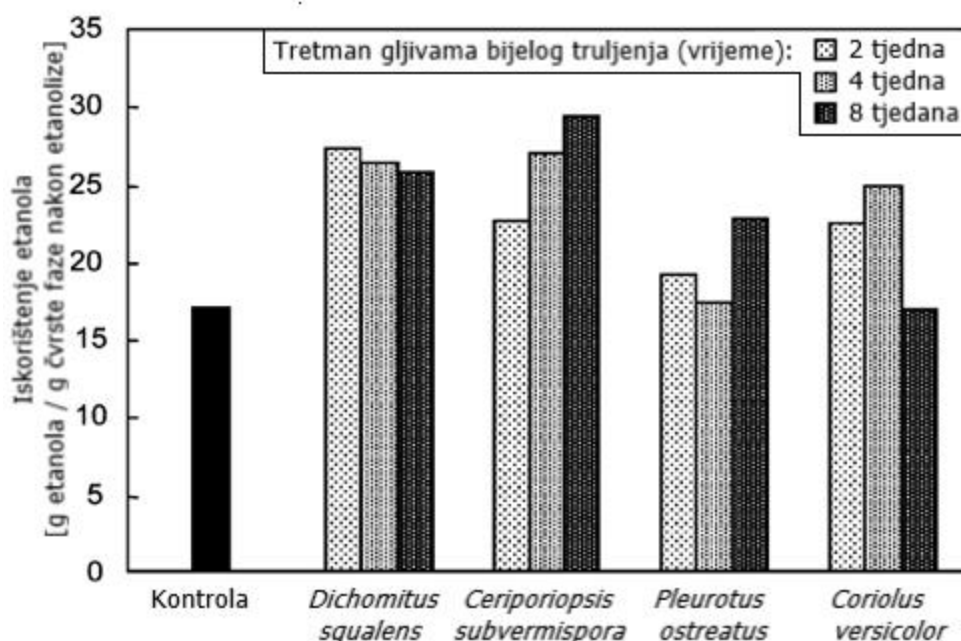
	Parametar	
Sastav čvrste faze	Celuloza u čvrstoj fazi [% w/w]	85,9
	Hemiceluloza u čvrstoj fazi [% w/w]	10,8
	AIL u čvrstoj fazi [% w/w]	1,0
	ASL u čvrstoj fazi [% w/w]	1,2
	Ukupni lignin u čvrstoj fazi [% w/w]	2,2
Učinci predobrade	Iskorištenje celuloze u čvrstoj fazi [% w/w]	91,6
	Iskorištenje hemiceluloze u čvrstoj fazi [% w/w]	24,5
	Iskorištenje lignina u čvrstoj fazi [% w/w]	4,2
	Indeks kristaliničnosti celuloze	78,7

Katsimpouras i sur. (2017) navode da najveći utjecaj na uklanjanje lignina ovom metodom imaju oksidacija kisikom te aceton kao organsko otapalo, dok je za hidrolizu hemiceluloze vrlo važan udio vode. Također, navode da je delignifikacija ovisna o stupnju hidrolize hemiceluloze, tj. da jača hidroliza hemiceluloze pospješuje uklanjanje lignina. Indeks kristaliničnosti celuloze u čvrstoj fazi nakon predobrade pri tim uvjetima bio je najveći, no to je posljedica toga što je i maseni udio celuloze u čvrstoj fazi također najveći nakon predobrade pri tim uvjetima. Pri temperaturi od 175 °C i vremenu zadržavanja od 2 h zapaženo je zadovoljavajuće iskorištenje celuloze. Nakon predobrade, čvrsta faza podvrgnuta je tzv. „High gravity“ simultanoj saharifikaciji i fermentaciji (SSF) uz predhidrolizu. Autori predlažu predhidrolizu u trajanju od 6 h za eventualnu industrijsku primjenu zbog veće produktivnosti procesa (Slika 19.). Koncentracija glukoze nakon takve predhidrolize premašuje 80 g/L (tj. iznosi 85,1 g/L), što je vrlo važno da bi se jeftinom destilacijom kasnije izdvojio etanol. Prinos etanola nakon 5 dana provedene „High gravity“ SSF iznosio je 75,9 g/L. Autori skreću pažnju na potrebu za daljnjim istraživanjima odvajanja lignina od smjese otapala za proizvodnju biokemikalija, budući da se ovim postupkom dobiva kvalitetan lignin visoke čistoće.



Slika 19. Porast masene koncentracije etanola tijekom simultane saharifikacije i fermentacije čvrste faze dobivene mokrom oksidacijom s acetonom uz predhidrolizu (Katsimpouras i sur., 2017).

Itoh i sur. (2003) su za čips japanske bukve (lat. *Fagus crenata*, eng. Siebold's beech, Japanese beech) koristili „bioorganosolve“ metodu predobrade primjenom gljiva bijelog truljenja i etanolize, nakon čega je slijedila simultana saharifikacija i fermentacija (SSF). Čips bukve prvo je tretiran gljivama bijelog truljenja kako bi došlo do biorazgradnje lignina. Kao najefikasnija gljiva bijelog truljenja pokazala se *Ceriporiopsis subvermispota* FP90031. Zatim je izvršena etanoliza te su odvojene čvrsta i tekuća faza. Čvrsta faza korištena je za simultanu saharifikaciju (komercijalne celulaze) i fermentaciju (*Saccharomyces cerevisiae* AM12). Rezultati su pokazali da čips bukve tretiran kombinacijom gljiva bijelog truljenja i etanolize daje 1,6 puta veće prinose etanola od predobrade samo etanolizom.



Slika 20. Prinosi etanola dobiveni simultanom saharifikacijom i fermentacijom čipsa japanske bukve nakon predobrade gljivama bijelog truljenja i etanolizom; Kontrolni stupac označava prinos etanola od SSF iz čvrste faze dobiven etanolizom na 180 °C (puni stupac) bez tretmana gljivama bijelog truljenja. Za etanol dobiven uz „bioorganosolve“ predobradu prikazani su prinosi u ovisnosti o vrsti gljive bijelog truljenja (Itoh i sur., 2003).

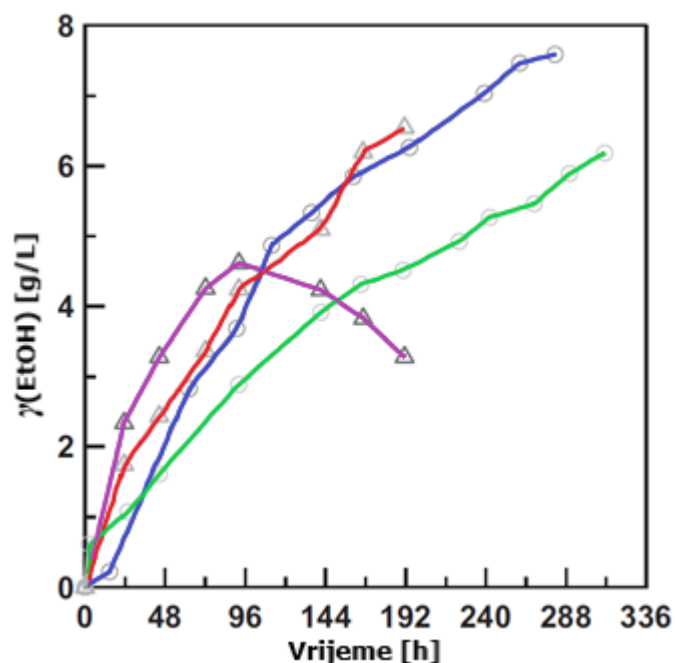
Tablica 14. Usporedba rezultata predobrade etanolizom (Itoh i sur., 2003)

Metoda predobrade	<i>Ceriporiopsis subvermispota</i> + etanoliza	Etanoliza
Rezultat predobrade		
Glukoza u čvrstoj fazi	0,454 [g/g sirovine]	0,442 [g/g sirovine]
Etanol nakon fermentacije	0,294 [g/g čvrste faze]	0,176 [g/g čvrste faze]
Ušteda električne energije	15 [%]	--

Prinosi etanola dobiveni simultanom saharifikacijom i fermentacijom čipsa bukve nakon predobrade gljivama bijelog truljenja i etanolizom (Itoh i sur., 2003) grafički su prikazani na Slici 20., gdje je vidljivo je da sirovina obrađena gljivom *Ceriporiopsis subvermispota* FP90031 daje najveća iskorištenja. Također je zapažena ušteda električne energije, čemu su razlog blaži uvjeti etanolize ukoliko je prethodno vršena predobrada gljivama bijelog truljenja. Usporedba rezultata predobrade etanolizom sa i bez gljiva bijelog truljenja prikazana je u Tablici 15. Autori ističu ekološku prikladnost ove metode, no svjesni su i mana, poput dugog vremena potrebnog za kultivacije gljiva bijelog truljenja. Predlažu recirkulaciju etanola za ispiranje i etanolizu, upotrebu ksiloze iz tekuće faze za proizvodnju biokemikalija (ksilitola) ili njenu fermentaciju u etanol pomoću pentozna-fermentirajućih mikroorganizama (npr. *Pichia* ili *Candida* spp.). Također, predlažu upotrebu biološki modificiranog lignina za proizvodnju biopolimera.

Brethauer i sur. (2017) istraživali su predobradu bukve (*Fagus sylvatica*) kombinacijom parne eksplozije i biološke razgradnje lignina s gljivama bijelog truljenja, u svrhu povećanja prinosa etanola simultanom saharifikacijom i fermentacijom (SSF). Kao sirovina je korištena bukva, čije su veličine čestica iznosile < 5 mm, a suha tvar je sadržavala 48 % w/w glukana, 19,1 % ksilana i 23,3 % netopljivog lignina. Simultana saharifikacija i fermentacija je vođena u membranskom aeriranom bioreaktoru. Aeracija se provodi difuzijom kroz membranu, na kojoj nastaje biofilm inokuliranih delignificirajućih organizama, tj. gljiva bijelog truljenja. Prvi sloj biofilma na membrani je aeriran, dok su u ostalom dijelu reaktora anaerobni uvjeti, potrebni za alkoholnu fermentaciju. Gljive bijelog truljenja (biofilm) izlučuju ekstracelularne enzime, poput peroksidaza i lakaza, koji razgrađuju lignin, dok se u anaerobnom dijelu bioreaktora provodi simultana saharifikacija i fermentacija dodatkom komercijalnih celulaza i inokulacijom kvasca. Kao najbolji delignificirajući organizam, obzirom na postignuto ošecerenje, bila je *Irpex lacteus* te je uzeta za daljnja istraživanja u predobradi. Ispitivani su različiti uvjeti parne eksplozije te prisutnost/odsustvo gljive *Irpex lacteus*, na prinos etanola i rezultati su naposljetku prikazani na dijagramu na Slici 21. uočeno je da u prvom slučaju (ljubičasto na Slici 21.) koncentracija etanola počinje opadati nakon četiri dana. Autori su postavili hipotezu da *Irpex lacteus*, na aerobnoj površini filma metabolizira dio etanola, zbog nedostatka tekuće faze dobivene predobradom. Naime, u tekućoj fazi se nalaze derivati ksilana, koje može metabolizirati samo *Irpex lacteus*. To potkrepljuju i ostali rezultati. U odsustvu gljive *Irpex lacteus*, ne dolazi do pada koncentracije etanola, isto kao ni kada su korištene obje faze dobivene parnom eksplozijom. U slučaju kada je sirovina podvrgnuta dvostupanjskoj parnoj eksploziji s ciljem bolje razgradnje ksilana te uz dodatak *Irpex lacteus*

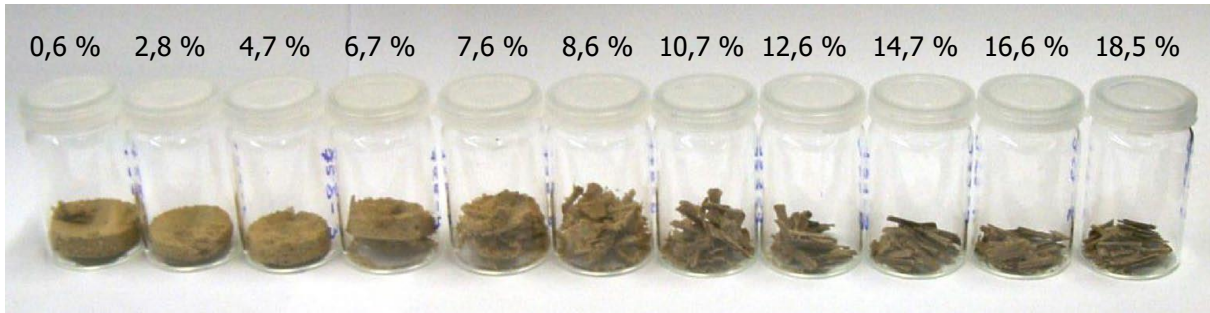
in situ u membranski aeriranom reaktoru, dobiveni su najbolji rezultati (plavo na Slici 21). Prinos etanola povećan je sa 65 % na 80 % u odnosu na SSF bez dodatka *Irpex lacteus in situ* (zeleno na Slici 21). Autori to pripisuju razgradnji inhibitora (fenolni spojevi, ksilooligomeri, ksiloza) u metabolizmu gljive *Irpex lacteus*.



Slika 21. Utjecaj *in situ* predobrade gljivom *Irpex lacteus* na SSF isprane čvrste faze te čvrste i tekuće faze obrađene parnom eksplozijom; isprana čvrsta faza nakon parne eksplozije (230 °C, 15 min) s *Irpex lacteus* (ljubičasto); isprana čvrsta faza nakon parne eksplozije (230 °C, 15 min) bez *Irpex lacteus* (crveno); sve tekuće i čvrste faze nakon dvostupanjske parne eksplozije (180 °C, 44 min; 230 °C, 8 min) s *Irpex lacteus* (plavo); sve tekuće i čvrste faze nakon dvostupanjske parne eksplozije (180 °C, 44 min; 230 °C, 8 min) bez *Irpex lacteus* (zeleno) (Brethauer i sur., 2017).

Viell i sur. (2016) proveli su predobradu čipsa bukve (*Fagus sylvatica*) ionskom tekućinom. Kao sirovina korišten je čips bukve iz drvo-prerađivačke industrije, dimenzija 10 mm × 0,2 mm × 0,7 mm. Ionska tekućina, korištena u ovom radu, je 1-etil-3-metilimidazolij (EMIMAc). Čips bukve podvrgnut je predobradi ionskom tekućinom (EMIMAc) različitim koncentracijama (različiti omjeri ionske tekućine i vode). Predobrada je provedena pri temperaturi od 115 °C u trajanju od 1,5 h. Uočeno je da su najveće morfološke promjene na sirovini nastale predobradom najkoncentriranijom ionskom tekućinom te se povećanjem udjela vode

smanjuju, odnosno u sirovini zaostaje sve više intaktnih struktura. Nakon predobrade s 10,7 % vode u ionskoj tekućini, morfološke promjene na sirovini su gotovo neprimjetne. Morfološke promjene čipsa bukve nakon predobrade u različitim uvjetima prikazane su na Slici 22.



Slika 22. Morfologija čipsa bukve prethodno obrađene smjesama 1-etil-3-metilimidazolija (EMIMAc) i vode; maseni udio vode povećava se slijeva udesno kako je naznačeno iznad uzoraka (Viell i sur., 2016).

3. ZAKLJUČAK

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

1. Tehnološki najzahtjevniji korak u proizvodnji biogoriva i biokemikalija iz lignoceluloznih sirovina je predobrada. Uvjete predobrade potrebno je prilagoditi odabranoj sirovini i karakteristikama određenog bioprocasa. Ovisno o odabranom postupku predobrade, postiže se djelomična razgradnja lignoceluloze do fermentabilnih šećera, djelomično ili gotovo potpuno uklanjanje lignina te dobivanje predobrađene sirovine s relativno visokim udjelom celuloze.
2. Pored jednostavnih jednostupanjskih procesa, u dostupnoj literaturi je opisana predobrada tvrdog drveta pomoću dvostupanjskih ili složenijih procesa. Pritom se koriste mehaničke, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke metode ili njihove kombinacije. U nekim slučajevima, nakon predobrade tvrdog drveta opisana je i primjena simultane enzimske saharifikacije i fermentacije.
3. Obična bukva (*Fagus sylvatica*) ima potencijal kao lignocelulozna sirovina u Republici Hrvatskoj obzirom na svoju rasprostranjenost i količinu dostupnog drvnog otpada. Različite metode predobrade bukovine opisane su u više znanstvenih radova. Spoznaje stečene o predobradi drugih vrsta tvrdog drveta također se mogu primijeniti za unapređivanje bioprocasa u kojima se bukovina može koristiti kao sirovina.
4. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi proizvodnja biogoriva i biokemikalija iz lignoceluloznih sirovina kao što je bukovina bila isplativa u industrijskom mjerilu.

4. LITERATURA

- Amin F. R., Khalid H., Zhang H., Rahman S., Zhang R., Liu G., Chen C. (2017) Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express* **7**(1): 72.
- Anonimus 1 (2020) Stablo, list i plod obične bukve <<https://www.etsy.com/fr/listing/506754735/1967-hetre-commun-fagus-sylvatica>> Pristupljeno 18. kolovoza 2020.
- Antonović A., Jambrečković V., Pervan S., Ištvanić J., Moro M., Zule J. (2007) Utjecaj lokaliteta uzorkovanja na grupni kemijski sastav bijeli bukovine (*Fagus sylvatica* L). *Drvna industrija* **58**(3): 1949-2019.
- Brethauer S., Lawrence S. R., Hans-Peter S. M. (2017). Enhanced simultaneous saccharification and fermentation of pretreated beech wood by in situ treatment with the white rot fungus *Irpex lacteus* in a membrane aerated biofilm reactor. *Bioresource technology* **237**: 135-138.
- Ceballos R. M., Batchenkova N. A., Chan M. K. Y., Duffing-Romero A. X., Nelson A. E., Man S. (2015). Bioethanol: feedstock alternatives, pretreatments, lignin chemistry, and the potential for green value-added lignin co-products. *Journal of Environmental Analytical Chemistry* **2**(5): 2380-2391.
- Chen, H. (2014). *Biotechnology of Lignocellulose: theory and practice*. Springer. London.
- Čavlović J., Anić I. (2008) Gospodarenje običnom bukvom u Hrvatskoj. *Gozdarski študijski dnevni* **26**: 1967-2019.
- Čavlović J., Antonić O., Božić M., Teslak K. (2012) Long-term and country scale projection of even-aged forest management: a case study for *Fagus sylvatica* in Croatia. *Scandinavian Journal of Forest Research* **27**(1): 36-45.
- Da Silva Perez D., Guillemain A., Berthelot A., N'guyen N., De Morogues F., Gomes C. (2010) Evaluation of forestry biomass quality for the production of second-generation biofuels. Institut Technologique FCBA, Domaine Universitaire, BP 251, 38044 - Grenoble, France.
- Eisenlauer M. i Teipel U. (2020) Comminution of Wood – Influence of Process Parameters. *Chemical Engineering* **43**(5): 838-847.
- Faulon J. L., Carlson G. A., Hatcher P. G. (1994) A three-dimensional model for lignocellulose from gymnospermous wood. *Organic Geochemistry* **21**(12): 1169-1179.
- Hallac B. B., Ragauskas A. J. (2011) Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **5**(2): 215-225.

- Harmsen, P. F. H., Huijgen, W., Bermudez, L., Bakker, R. (2010) Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. Report number: ECN-E—10-013. Wageningen UR-Food & Biobased Research, 27-28.
- Ilić M. (2019) Predobrada čipsa bukve razrijeđenom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Isikgor H. F., Becer C. R. (2015) Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry* **6**(25): 4497-4559.
- Ištvančić J., Antonović A., Pervan S., Jambrečković V., Benković Z., Kavran M. (2008) Pitanarstvo u Republici Hrvatskoj, II. dio – Hrvatsko pitanarstvo. *Drvena industrija* **59**(4): 1949-2019.
- Itoh H., Wada M., Honda Y., Kuwahara M., Watanabe T. (2003) Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of Biotechnology* **103**(3): 273-280.
- Ivančić Šantek M., Miškulin E., Beluhan S., Šantek B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kemija u industriji* **65**(1-2): 25-38.
- Kalogiannis K. G., Matsakas L., Aspden J., Lappas A. A., Rova U., Christakopoulos P. (2018) Acid Assisted Organosolv Delignification of Beechwood and Pulp Conversion towards High Concentrated Cellulosic Ethanol via High Gravity Enzymatic Hydrolysis and Fermentation. *Molecules* **23**(7): 1647.
- Katsimpouras C., Kalogiannis K. G., Kalogianni A., Lappas A. A., Topakas E. (2017) Production of high concentrated cellulosic ethanol by acetone/water oxidized pretreated beech wood. *Biotechnol Biofuels* **10**(1): 54.
- Lee R. H., Kazlauskas R. J., Hyun Park T. (2017) One-step pretreatment of yellow poplar biomass using peracetic acid to enhance enzymatic digestibility. *Scientific Reports* **7**(1): 1-10.
- Marić V. (2000) Biotehnologija i sirovine, 1.izd., Stručna i poslovna knjiga. str. 93-95.
- Mohsenzadeh A., Jeyhanipour A., Karimi K., Taherzadeh M. J. (2012) Alkali pretreatment of softwood spruce and hardwood birch by NaOH/thiourea, NaOH/urea, NaOH/urea/thiourea, and NaOH/PEG to improve ethanol and biogas production. *Chemical Technology and Biotechnology* **87**(8): 1209-1214.
- Mussatto S. I., Ballesteros L. F., Martins S., Teixeira J. A. (2009) Use of agroindustrial wastes in solid-state fermentation processes. U: *Biotechnology for agroindustrial residues*, Singh nee' Nigam P. Pandey A., ur., 1. izd., Intechopen. str. 121-140.

- Nimz, H. (1974) Beech lignin—proposal of a constitutional scheme. *Angewandte Chemie International Edition in English* **13**(5): 313-321.
- Nunes C.S., Kunamneni A. (2018) Laccases—properties and applications. U: *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. Nunes C. S. i Kumar V., ur., Academic press. London. str. 133-161.
- Pine S. H., Hendrickson J. B., Cram D. J., Hammond G. S. (1984) *Organska kemija*, 2. prom. izd., Školska knjiga. str. 767.
- Pravilnik o područjima provenijencija svojti šumskog drveća od gospodarskog značaja (NN 107/08), <https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_09_107_3185.html> Pristupljeno 18. kolovoza 2020.
- Rezić T., Ivančić Šantek M., Andlar M., Pavlečić M., Šantek B. (2016). Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanol iz lignoceluloznih sirovina. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **11**(1-2): 6-17.
- Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A Review. *Bioresource technology* **83**(1): 1-11.
- Strategija gospodarenja otpadom Republike Hrvatske (NN 178/05) <https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_11_1302398.html> Pristupljeno 13. lipnja 2020.
- Tomaš-Pejo E., Alvira P., Ballesteros M., Negro M. J. (2011). Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. U *Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes*, 1. izd., Pandey A., Larroche C., Ricke S., Dussap C.-G., Gnansounou E., ur., Academic press. str. 168-169.
- Vidal Jr. B. C., Dien B. S., Ting K. C., Singh V. (2011) Influence of Feedstock Particle Size on Lignocellulose Conversion—A Review. *Appl Biochem Biotechnol* **164**(8):1405–1421.
- Viell J., Inouye H., Szekely N. K., Frielinghaus H., Marks C., Wang Y., Anders N., Spiess A. C., Makowski L. (2016) Multi-scale processes of beech wood disintegration and pretreatment with 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate/water mixtures. *Biotechnology for Biofuels* **9**(1): 7.

Izjava o izvornosti

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

Marko Bnovac

ime i prezime studenta