

Proizvodnja bioetanola na blago kiselinskom hidrolizatu pšenične slame dobivenom pomoću fosforne kiseline u različitim mjerilima

Galić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:641134>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2017. godine

Maja Galić

852/BPI

**Proizvodnja bioetanola na blago
kiselinskom hidrolizatu pšenične
slame dobivenom pomoću fosforne
kisljine u različitim mjerilima**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Božidara Šanteka, redovitog profesora u trajnom zvanju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr. sc. Marija Novaka i mag.ing. Nenada Marđetka.

Diplomski rad je izrađen u okviru HRZZ projekta „Proizvodnja bioetanol i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina na principima ekološke i ekonomske održivosti“ (SPECH-LRM; šifra projekta 9158).

ZAHVALA:

Posebno zahvaljujem svom mentoru prof.dr.sc. Božidaru Šanteku koji mi je omogućio rad na ovom projektu te podjelio svoje bogato znanje i iskustvo. Hvala mu na uloženom vremenu i strpljenju.

Zahvaljujem dr. sc. Mariju Novaku, dr. sc. Antoniji Trontel i mag.ing.bioproc. Nenadu Marđetku na pomoći, podršci, konstruktivnim savjetima i prenesenom znanju u svakom trenutku izrade ovog rada.

Također se zahvaljujem svim drugim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva koji su pomagali u odradi eksperimenata.

Posebnu i iskrenu zahvalu želim izreći svojim dvjema kolegicama, Marini i Petri, na odličnom društvu u laboratoriju te svim savjetima i pomoći.

Posebno se želim zahvaliti svojoj obitelji koji su me tokom čitavog mog školovanja podupirali i poticali te veliko hvala Domagoju i svim prijateljima na pomoći i podršci koju su mi pružili tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

PROIZVODNJA BIOETANOLA NA BLAGO KISELINSKOM HIDROLIZATU PŠENIČNE SLAME DOBIVENOM POMOĆU FOSFORNE KISELINE U RAZLIČITIM MJERILIMA

Maja Galić, 852/BPI

Sažetak:

Bioetanol je važan obnovljiv izvor energije koji ima veliki potencijal za zamjenu fosilnih transportnih goriva. Velike količine jeftinih industrijskih i poljoprivrednih ostataka idealne su sirovine za proizvodnju bioetanola pri čemu se njihovim zbrinjavanjem sprječava zagađenje okoliša. Pšenična slama je dobar primjer takve sirovine koji se može primjeniti u procesu proizvodnje bioetanola. Međutim, pšenična slama mora proći proces predobrade da bi se mogla primjeniti u procesu proizvodnje bioetanola. U ovom istraživanju proučavan je proces blago kisele hidrolize pomoću fosforne kiseline u visokotlačnom reaktoru pri različitim kombinacijama parametara procesa predobrade. Proučavane su različite kombinacije svih parametara procesa predobrade: temperatura (160 – 200 °C), vrijeme zadržavanja (1 - 10 minuta) i koncentracije fosforne kiseline (0,5 – 2,0 %). Najveća koncentracija fermentabilnih šećera zabilježena je u tekućem dijelu hidrolizata pšenične slame kod predobrade na 180 °C, vremenu zadržavanja od 10 minuta i koncentraciji H₃PO₄ od 2,0 %. U čvrstom dijelu hidrolizata pšenične slame kod prethodno navedenih uvjeta detektirani su ovi sastojci: glukan (42,43 %), ksilan (19,64 %), arabinan (9,01 %). Dobiveni hidrolizati pšenične slame korišteni su za anaerobni uzgoj divljeg i genetički modificiranog soja (Y9) kvasca *S. cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama i horizontalno rotirajućem cijevnom bioreaktoru. Najuspješniji anaerobni uzgoj genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae* Y9 proveden je na hidrolizatu pšenične slame dobivenom pri temperaturi od 180 °C, vremenu zadržavanja od 10 minuta i koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 % u HRCB-u pri čemu su dobiveni ovi pokazatelji uspješnosti bioprocasa: Pr: 0,0057 gL⁻¹h⁻¹, Y_{P/S}: 0,058 gg⁻¹, E: 11,34 %.

Ključne riječi: bioetanol, pšenična slama, blago kisela predobrada, visokotlačni bioreaktor, horizontalno rotirajući cijevni bioreaktor, različiti sojevi kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*

Rad sadrži: 101 stranica, 27 slika, 14 tablica, 130 literaturnih referenci, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Božidar Šantek

Pomoć pri izradi: mag.ing. Nenad Marđetko

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Datum obrane: 26. rujan, 2017. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

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

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

BIOETHANOL PRODUCTION ON THE MILD ACID HYDROLYSATES OF WHEAT STRAW OBTAINED BY PHOSPHORIC ACID AT VARIOUS SCALES

Maja Galić, 852/BPI

Abstract:

Bioethanol is an important renewable energy source that has great potential to replace fossil transportation fuels. Large quantities of cheap industrial and agricultural residues are the ideal raw materials for the production of biethanol, whereby their disposal prevents environmental pollution. Wheat straw is a good example of such raw materials that can be applied in the production process of bioethanol. However, wheat straw has to go through the process of pretreatment that could be applied in the production process of bioethanol. In this study, the process of mild acid hydrolysis by phosphoric acid in a high - pressure reactor at various combinations of processing parameters was studied. Various combinations of all processing parameters: temperature (160 - 200 °C), holding time (1 - 10 minutes) and phosphoric acid concentration (0.5 - 2.0%) were studied. The highest concentration of fermentable sugar was observed in the liquid hydrolyzate of wheat straw pretreated at 180 °C, residence time of 10 minutes and a concentration of 2,0 % H₃PO₄. In the solid hydrolyzate of wheat straw, at previous conditions, these components are detected: glucan (42,43 %), xylan (19,64 %), arabinan (9,01 %). The obtained hydrolyzate of wheat straw was used for anaerobic cultivation of wild and genetically modified yeast *S. cerevisiae*, Y9 in Erlenmeyer flasks and horizontally rotating tubular bioreactor. The most successful anaerobic cultivation of genetically modified yeast *S. cerevisiae*, Y9 was carried out on the hydrolyzate of wheat straw obtained at 180 °C, 10 minute retention time and 2.0% phosphoric acid concentration in HRCB, where these bioprocess performance indicators were obtained: Pr: 0.0057 gL⁻¹h⁻¹, Y_{P/S}: 0.058 gg⁻¹, E: 11.34%.

Keywords: bioethanol, wheat straw, mild acidic pretreatment, high - pressure bioreactor, horizontally rotating tubular bioreactor, different strains of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis contains: 101 pages, 27 figures, 14 tables, 130 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 Božidar Šantek, Full professor

Technical support and assistance: M.Sc. Nenad Marđetko

Reviewers:

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

Paper defended: September 26th, 2017

SADRŽAJ

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO	3
2.1.BIOGORIVA	3
2.1.1. Bietanol : karakteristike i upotreba.....	3
2.1.2. Proizvodnja biogoriva iz sirovina prve generacije	4
2.1.3. Proizvodnja biogoriva iz sirovina druge generacije	5
2.2.SIROVINE ZA PROIZVODNJU BIOETANOLA	5
2.2.1. Šećerne sirovine	5
2.2.2. Škrobne sirovine.....	6
2.2.3. Lignocelulozne sirovine	6
2.3.1. Predobrada lignocelulozne sirovina	10
2.3.2. Enzimaska hidroliza lignocelulozne sirovine.....	11
2.3.3. Mikroorganizmi u proizvodnji bioetanola.....	12
2.3.4. Tehnike vođenja procesa proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina	13
2.4.NASTANAK INHIBITORA TIJEKOM PROCESA PREDOBRADE LIGNOCELULOZNIH SIROVINA	14
3.EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1.MATERIJALI	17
3.1.2. Kemikalije	18
3.1.3. Radni mikroorganizam	19
3.1.4. Hranjive podloge	19
3.1.5. Aparature i uređaji.....	23
3.2.METODE	28
3.2.1. Održavanje čiste kulture i uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
3.2.2. Određivanje sastava pšenične slame korištene za preobradu u visokotlačnom reaktoru	28
3.2.3. Kiselinska predobrada lignocelulozne sirovine.....	29
3.2.4. Određivanje sastava lignocelulozne sirovine	32
3.2.5. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	35
3.2.6. Određivanje koncentracije glukoze i ksiloze pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC)	37
3.2.7. Anaerobni šaržni uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> u Erlenmeyer tikvicama.....	38
3.2.8. Anaerobni šaržni uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> u horizontalnom cijevnom rotirajućem bioreaktoru (HRCB).....	39
3.2.9. Nadzor anaerobnog uzgoja kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39

3.2.10. Pokazatelji uspješnosti odvijanja bioprocasa	41
4. REZULTATI I RASPRAVA	43
4.1.1. Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri različitim koncentracijama fosforne kiseline	45
4.1.2. Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama i vremenima zadržavanja uz koncentraciju fosforne kiseline od 2,0 %.....	52
4.2. ŠARŽNI ANAEROBNI UZGOJ KVASCA <i>Saccharomcey cerevisiae</i> (DIVLJI TIP) I GENETIČKI MODIFICIRANOG KVASCA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y9 NA HIDROLIZATU PŠENIČNE SLAME U ERLIENMEYER TIKVICAMA.....	63
4.2.1. Šaržni anaerobni uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (divlji tip) na hidrolizatu pšenične slame u Erlenmeyer tikvicama	65
4.2.1 Šaržni anaerobni uzgoj genetički modificiranog kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y9 na hidrolizatu pšenične slame u Erlenmeyer tikvicama	71
4.3. ŠARŽNI ANAEROBNI UZGOJ GENETIČKI MODIFICIRANOG KVASCA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y9 NA HIDROLIZATU PŠENIČNE SLAME U HORIZONTALNO ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM BIOREAKTORU (HRCB-u)	87
5.ZAKLJUČCI	91
6. POPIS LITERATURE.....	93
7. PRILOZI	99
7.1. BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UGLJIKOHIDRATA I PROIZVODA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)	99
7.2. BAŽDARNI DIJAGRAMI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FURANA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) ..	101

1.UVOD

Svijet se danas suočava sa progresivnim trošenjem izvora energije, koji su uglavnom bazirani na neobnovljivim gorivima (ugljen, nafta, prirodni plin). Intenzivno korištenje fosilnih goriva dovodi do generiranja otpadnih plinova (uglični monoksid, ugljični dioksid, sumporni dioksid) koji se ispuštaju u atmosferu što uzrokuje promjene u globalnoj klimi (Sánchez i Cordona, 2008). Lignocelulozna biomasa predstavlja obećavajuću sirovinu i obnovljiv izvor energije za funkcioniranje modernog industrijskog društva (Anwar i sur., 2014). Značajna količina otpadnih nusproizvoda generira se kroz poljoprivrednu proizvodnju (Pérez, Muñoz-Dorado de la Rubia; Martinez, 2002). Kroz uporabu obnovljivih izvora energije čovječanstvo može doći do alternativnog rješenja za energetske potrebe bez negativnog utjecaja na okoliš (Sánchez i Cordona, 2008). Većina poljoprivredne lignocelulozne biomase ima 10-25 % lignina, 20-30 % hemiceluloze i 40-50 % celuloze (Iqbal i sur., 2011; Kumar i sur., 2009; Malherbe i Cloete, 2002). Atraktivna alternativa za proizvodnju bioetanola je pšenična slama. Pšenica je najrašireniji usjev u više od 150 zemalja te raste u širokom rasponu okolišnih uvjeta (Talebna i sur., 2010). Bioetanol je gorivo proizvedeno iz obnovljivih sirovina, danas još uvijek najvećim dijelom iz kukuruza i šećerne trske ili repe, ovisno o geografskom području (Ivančić Šantek i sur., 2016). Zbog složenosti procesa proizvodnje, cijena etanola proizvedenog iz lignoceluloznih sirovina je dva do tri puta veća od cijene etanola dobivenog iz šećerne trske, odnosno od cijene benzina (Balat i Balat, 2009). Proces fermentacije moguće je provoditi uz pomoć različitih mikroorganizama kao što su bakterije, kvasci i plijesni. Jedan od najproučavanijih i najkorištenijih kvasaca je *Saccharomyces cerevisiae* koji ima sposobnost sinteze etanola kao glavnog proizvoda fermentacije (Tesfaw i Assefa, 2014). Jedan od glavnih nedostataka proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina je što kvasac *S. cerevisiae* ima sposobnost metaboliziranja samo određenih monosaharida i disaharida kao što su glukoza, fruktoza, manoza i saharoza, a nema sposobnost korištenja pentoza koje nastaju tijekom hidrolize hemiceluloze (npr. ksiloza i arabinoza) (Sánchez i Cordona, 2008). Primjenom tehnika genetičkog inženjerstva nastoje se poboljšati svojstva mikroorganizama koji se već primjenjuju u fermentaciji etanola. Mikroorganizmima s visokom celulaznom aktivnošću poboljšavaju se fermentacijska svojstva, a mikroorganizmima sa zadovoljavajućim fermentacijskim svojstvima dodaju se celulolitička i/ili hemicelulolitička aktivnost (Ivančić Šantek i sur., 2016). Glavni izazov procesa proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina je proces predobrade. Cilj predobrade je smanjenje stupnja kristaličnosti celuloze i povećanje frakcije amorfnе celuloze.

Nadalje, predobradom većina hemicelulozne frakcije trebala bi se razgraditi dok bi lignin trebao biti oslobođen ili čak razgrađen (Sánchez i Cordona, 2008).

Cilj ovog rada bio je provesti predobradu pšenične slame s različitim koncentracijama fosforne kiseline ($w_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 \%$) pri različitim temperaturama i vremenima zadržavanja, te odrediti optimalne uvjete predobrade pšenične slame. Nadalje, predobrađena pšenična slama korištena je kao sirovina za šaržni proces proizvodnje bioetanola pomoću divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* i genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama. Nakon definiranja optimalnih uvjeta bioprocasa pri kojima se ostvaruje najveći udio fermentabilnih šećera uz najmanji udio inhibitora fermentacije proveden je šaržni proces proizvodnje bioetanola pomoću genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору (HRCB).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIOGORIVA

Fosilna goriva imaju široku primjenu kao izvor energije zbog svoje velike energetske vrijednosti i visoke kvalitete izgaranja. Međutim, zalihe fosilnih goriva svakim danom se sve više iscrpljuju što predstavlja veliki problem čovječanstva 21. stoljeća (Hassan i Kalam, 2013). Nestabilna cijena goriva i petrokemijskih sirovina, te potreba za sigurnijom dobavom energije pridonjeli su povećanju proizvodnje alternativnih goriva, tzv. biogoriva. Biogoriva se dobivaju preradom obnovljivih izvora energije, biomase, koja je najstariji izvor energije i predstavlja skupni pojam za brojne proizvode biljnog i životinjskog porijekla (Ivančić Šantek i sur., 2016). Biomasa (drveće, ostaci poljoprivredne industrije, brzorastuće trave, vodene biljke) predstavlja važnu sirovinu za kemijsku industriju (Naik i sur., 2010). Nadalje, biomasa se upotrebljava u kućanstvima za grijanje i kuhanje, proizvodnju električne energije i topline, te sve više u proizvodnji biogoriva: etanola, metanola, biodizela (Pavlečić i sur., 2012). Bioetanol se smatra jednim od najvažnijih obnovljivih izvora energije koji ima mogućnost djelomične zamjene fosilnih goriva (Kang i sur., 2014). Svjetska proizvodnja biogoriva se od 2007. do 2012. godine povećala sa 50 milijardi litara na preko 100 milijardi litara (Kang i Apells, 2014.). Prema nekim istraživanjima godišnja proizvodnja bioetnola na svjetskoj razini do 2020. godine mogla bi premašiti 125 milijardi litara (Demirbas, 2007). Ovisno o vrsti korištene biomase biogoriva se dijele u 3 skupine: biogoriva prve generacije (biogoriva proizvedena iz biomase bogate šećerom i škrobom), biogoriva druge generacije (biogoriva proizvedena iz lignocelulozne biomase) i biogoriva treće generacije (biogoriva proizvedena iz biomase mikroorganizama i algi) (Nigam i Singh, 2011).

2.1.1. Bioetanol : karakteristike i upotreba

Etanol se može proizvesti petrokemijskim i fermentacijskim postupkom. Petrokemijski ili sintetski etanol je etanol sintetiziran iz etilenskih sirovina (Pavlečić, 2012). Najčešće se primjenjuje u industrijske svrhe za sintezu drugih spojeva kao što su octena kiselina, butadien, etilni klorid (Mills i Ecklund, 2007). Fizikalno-kemijske karakteristike

bioetanola i benzina značajno su različite. Energetski sadržaj bioetanola iznosi 21,2 MJ/litri, a benzina 31,2 MJ/litri. Prema tome bioetanol ima 67 % energije koju sadrži benzin te zbog toga bioetanol smanjuje snagu motora za oko 33 % u usporedbi s benzinom. Međutim, kada se bioetanol koristi u relativno malim koncentracijama u smjesi sa fosilnim gorivom (tj. E-5 ili E-10) ovaj efekt je višestruko smanjen (Zavargo i sur., 2008). Za razliku od benzina, etanol dobro provodi električnu struju, vrlo čisto izgara te se na ventilima ne stvaraju talozi i nečistoće. Temperatura paljenja i latentna toplina isparavanja etanola znatno su veće nego za benzin, zbog čega alkoholna goriva slabije isparavaju, što uzrokuje probleme pri pokretanju vozila pri niskim temperaturama. U odnosu na benzin, etanol ima veću oktansku vrijednost i mnogo je korozivniji. Molekula etanola sadrži kisik, što omogućava potpunije sagorijevanje ugljikovodika, smanjenje emisije stakleničkih plinova (ugljikova monoksida i dušikovih oksida) te toksičnosti aromatskih spojeva (Ivančić Šantek i sur., 2016).

Bioetanol se proizvodi fermentacijom sirovine, a primjenjuje se kao pogonsko gorivo u smjesi s benzinom ili čist. U smjesama s benzinom upotrebljava se bezvodni etanol minimalne čistoće od 99,5 % - 99,8 % (Ivančić Šantek i sur., 2016). Od 70-ih godina prošlog stoljeća u SAD-u i Brazilu etanol se miješa sa benzinom u različitim udjelima i koristi kao pogonsko gorivo za automobile. Međutim, njegova primjena je ograničena samo na vozila koja su prilagođena radu na etanol ili smjesu benzina i etanola. Smjese sa manjim udjelom etanola mogu se primjeniti u većini suvremenih automobila pogonjenih benzinom, dok smjese s više od 20 % (v/v) etanola zahtjevaju preinake na motoru. U SAD-u se najčešće koristi E-85 (smjesa od 85 % bioetanola i 15 % benzina), dok u Brazilu E-25 (smjesa od 25 % bioetanola i 75 % benzina). Na europskom tržištu koristi se E-5 ili E-10 (smjesa od 5-10 % bioetanola) te za razliku od E-25 ili E-85 ne zahtjeva preinake na motoru. Najveći svjetski proizvođači i potrošači bioetanola su SAD i Brazil. U SAD-u više od 95 % etanola proizvedeno je iz kukuruza dok je u Brazilu glavna sirovina za proizvodnju bioetanola šećerna trska zbog njezine dobre prilagodbe na tamošnje tlo i vremenske uvjete (Sánchez i Cordona, 2008). U nekim gradovima Švedske, koja je najveći europski proizvođač etanola, etanol se koristi kao gorivo za pogon autobusa javnog prijevoza.

2.1.2. Proizvodnja biogoriva iz sirovina prve generacije

Tri najvažnije skupine biogoriva prve generacije su biodizel, bioetanol i bioplin (Naik i sur., 2010). Biodizel je zamjena za dizel i proizvodi se kroz transesterifikaciju biljnih ulja,

otpadnih ulja i masti životinjskog porijekla. Kao glavna sirovina za proizvodnju bioetanola koristi se šećerna trska u obliku tršćanog soka ili melase (nusproizvod u proizvodnji šećera). S obzirom da se radi o sirovinama koje su izvor saharoze nije potrebna nikakva predobrada supstrata što uvelike smanjuje trošak cijelog procesa proizvodnje (Sánchez i Cordona, 2008).

2.1.3. Proizvodnja biogoriva iz sirovina druge generacije

Sirovina za proizvodnju biogoriva druge generacije je lignocelulozna biomasa koja predstavlja obilan, jeftin i dostupan izvor. Za razliku od biogoriva prve generacije, proizvodnja biogoriva iz lignoceluloznih sirovina ne konkuriira proizvodnji hrane i nije uzročnik oscilaciji cijene prehrambenih proizvoda (Rezić i sur., 2016). Iako su jeftinije od šećernih i škrobnih sirovina, proizvodnja biogoriva iz lignoceluloznih sirovina danas još uvijek nije isplativa zbog velikog broja tehničkih nedostataka bioprocasa (Naik i sur., 2010). U biogoriva druge generacije spadaju etanol, butanol, biodizel itd.

2.2. SIROVINE ZA PROIZVODNJU BIOETANOLA

Sirovine značajne za industrijsku proizvodnju bioetanola su : sirovine bogate šećerima (melasa, šećerna repa, šećerna trska), odnosno škrobom (kukuruz i kukuruzne preradevine) i lignocelulozne sirovine (ostaci drvene biomase, poljoprivredni ostaci). Razina kompleksnosti proizvodnje bioetanola ovisi o korištenoj sirovini.

2.2.1. Šećerne sirovine

U industrijskoj proizvodnji bioetanola od šećernih sirovina koriste se melasa, pulpa šećerne repe i trske, ugušćeni sok šećerne repe, sulfitna lužina, hidrol ili različiti voćni sokovi. Najčešće korištena šećerna sirovina za proizvodnju bioetanola je šećerna trska u formi tršćanog soka ili melase (nusproizvod proizvodnje šećera, Cordona i Sánchez, 2008). U Brazilu se 79 % šećera proizvodi iz soka šećerne trske dok se ostatak proizvodi iz šećerne melase (Wilkie i sur., 2000). Najčešće korišteni mikroorganizam za proizvodnju bioetanola iz šećernih sirovina je kvasac *Saccharomyces cerevisiae* zbog sposobnosti hidrolize saharoze do heksoza (glukoze i fruktoze) koje može lako asimilirati. Mnoge šećerane uz postrojenje za proizvodnju šećera

imaju i postrojenje za proizvodnju bioetanola. Nusproizvodi proizvodnje šećera iz šećerne repe (melasa i repini rezanci), kao i međuprodukti proizvodnje šećera (rijetki i gusti sok) mogu se također primjeniti za proizvodnju bioetanola (Henke i sur., 2005). U Brazilu se najčešće primjenjuje Melle-Boinotov šaržni postupak s pritokom supstrata (70 - 80 %) koji se provodi na način da se po završetku fermentacije biomasa kvasca izdvaja centrifugiranjem, dezinficira dodatkom sumporne kiseline te se ponovno upotrebljava u narednoj fermentaciji (Sánchez i Cordona, 2008).

2.2.2. Škrobne sirovine

Škrob je polimer D-glukoze, te se sastoji od 30 % dugih ravnolančanih molekula amiloze spiralno uvijenih u obliku heliksa i približno 70 % razgranatih molekula amilopektina. Za razliku od proizvodnje bioetanola iz šećernih, proizvodnja etanola iz škrobnih sirovina zahtjeva određene procese predobrade. Tradicionalno hidroliza škroba se provodila kiselinama, međutim danas se u tu svrhu koriste amilolitički enzimi (npr. α i β amilaze) zbog njihove velike specifičnosti i blagih uvjeta reakcije (Cordona i Sánchez, 2008). U zemljama Sjeverne Amerike i Europe škrobne sirovine, kukuruz i pšenica, najčešće se upotrebljavaju u proizvodnji bioetanola.

2.2.3. Lignocelulozne sirovine

Lignocelulozne sirovine predstavljaju najrasprostranjeniju i najjeftiniju sirovinu za proizvodnju bioetanola s obzirom da predstavlja otpad iz različitih industrija. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina nije komercijalizirana, ali postoji nekoliko pilot postrojenja (Thomsen i sur., 2008). Zbog složenosti procesa proizvodnje etanola iz lignocelulozne sirovine cijena gotovog proizvoda još uvijek je veća od cijene etanola dobivenog iz šećerne trske, šećerne repe ili kukuruza. Međutim, zbog rasta cijene sirovine koje se upotrebljavaju u proizvodnji hrane i krmiva poput kukuruza, pšenice i šećerne trske upravo lignocelulozna biomasa postaje sve važnija sirovina (Ivančić Šantek i sur., 2016). Lignocelulozne sirovine prije fermentacije zahtjevaju fizikalno – kemijski predtretman nakon čega slijedi enzimska hidroliza. Danas postoje brojna istraživanja s ciljem razvoja procesa proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina u velikom mjerilu. Glavni limitirajući faktor

u razvoju industrijskog procesa proizvodnje je visok stupanj kompleksnosti lignoceluloznih sirovina što je povezano sa njihovom prirodom i strukturom. Upravo zbog toga proces proizvodnje bjetanola iz lignoceluloznih sirovina još uvijek je vrlo složen, energetski zahtjevan i nedovoljno razvijen (Cordona i Sánchez, 2008).

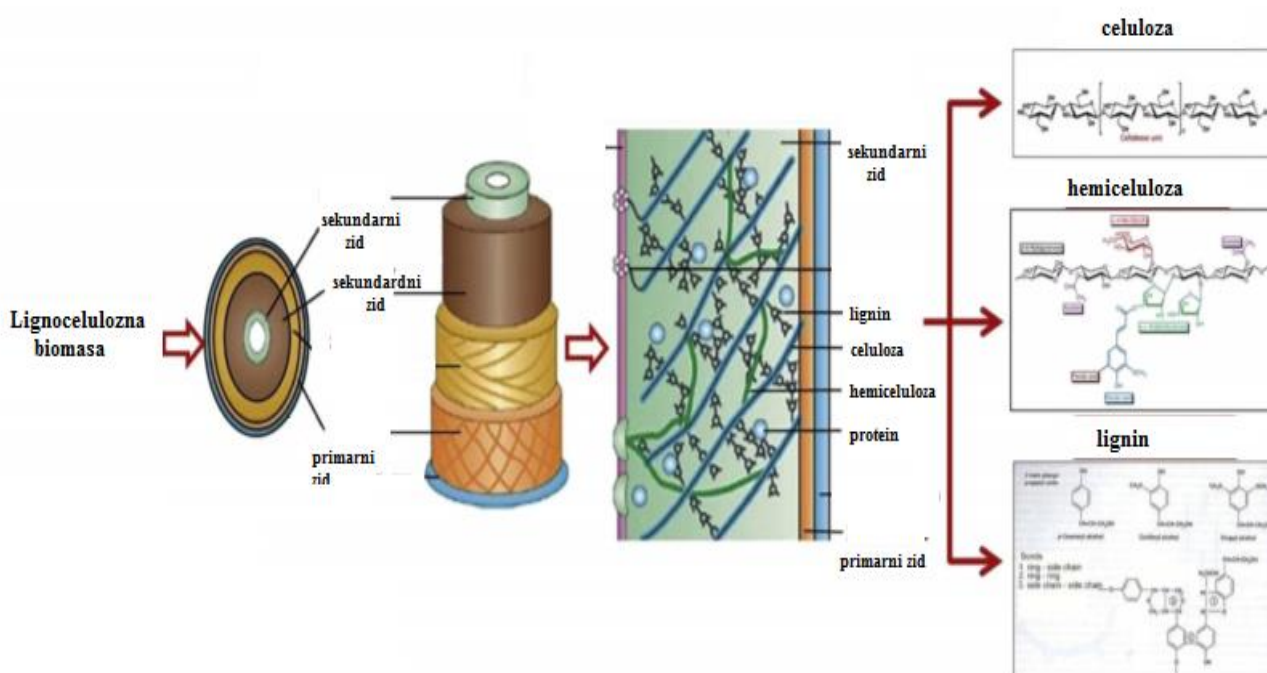
2.2.3.1. Građa lignoceluloznih sirovina

Lignocelulozne sirovine sastoje se iz tri glavna polimera: celuloze ($C_6H_{10}O_5$)_n (30 -50 % suhe tvari), hemiceluloze ($C_5H_8O_4$)_m (20 – 30 % suhe tvari) i lignina $C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0,9-1,7}$ _n (10 – 25 % suhe tvari). Također sadrže manje količine pektina, proteina, ekstraktivnih tvari i pepela. Struktura lignoceluloznih materijala je vrlo kompleksna, a sastav joj ovisi o vrsti lignocelulozne sirovine (Chandel i sur., 2012).

Celuloza je linearni polimer D-glukočnih jedinica povezanih β-1,4-glikozidnom vezom pri čemu su prisutne kristalične i amorfne strukture polimera celuloze. Celuloza je najzastupljeniji polimer i prosječno čini 40-50 % njene mase (Chandel i sur., 2012). Hidroksilne skupine u lancima celuloze formiraju vodikove veze unutar istog lanca (intramolekulske vodikove veze) te između paralelno posloženih lanaca (intermolekulske vodikove veze). Velik broj vodikovih veza odgovoran je za visok stupanj kristaličnosti native celuloze. Manji dio celuloze je u amorfnom obliku i podložniji enzimskoj hidrolizi od kristalične strukture (Hendriks i Zeeman, 2009; Laureano – Perez i sur., 2005). Lanci celuloze međusobno povezani vodikovim vezama tvore tzv. osnovna vlakna koja mogu sadržavati i do 36 celuloznih lanaca (Mutwil, 2008; Somerville, 2006). Osnovna celulozna vlakna povezana su u mikrovlakna čija duljina i dijametar ovisi o vrsti biljke i tkiva (Chinga – Carrasco, 2011). Celulozna mikrovlakna međusobno su povezana hemicelulozom, te su prekriveni ligninom koji daje mehaničku čvrstoću staničnoj stijenci (Slika 1.).

Hemiceluloza je heteropolisaharid sastavljen od linearnih i razgranatih lanaca polimera sastavljenih od od pentoznih jedinica monosaharida (ksiloze i arabinoze) i heksoznih jedinica monosaharida (manoze, glukoze, galaktoze) i šećernih kiselina (4-O-metil-galakturonska kiselina), Za razliku od celuloze, hemiceluloza ima amorfnu strukturu i lako se hidrolizira razrijeđenim kiselinama i lužinama. U lignoceluloznoj sirovini celuloza i lignin međusobno su čvrsto vezani upravo zahvaljujući hemicelulozi koja se nalazi između lignina i celuloze i ponaša kao „ljepilo“ (Chandel i sur., 2012).

Lignin je makromolekulski polifenol složene građe i heterogenog sastava. Nalazi se u staničnoj stijenci biljaka vezan za celulozna vlakna u tzv. lignocelulozni kompleks. Građen je od fenilpropanskih jedinica pretežno kumaril alkohola, koniferil alkohola i sinapil alkohola koji su međusobno povezani različitim vrstama kemijskih veza. Sloj lignina tvori nepropusnu prepreku u staničnoj stijenci te daje biljci mehaničku čvrstoću i fizičku zaštitu od oksidacijske i mikrobne razgradnje.

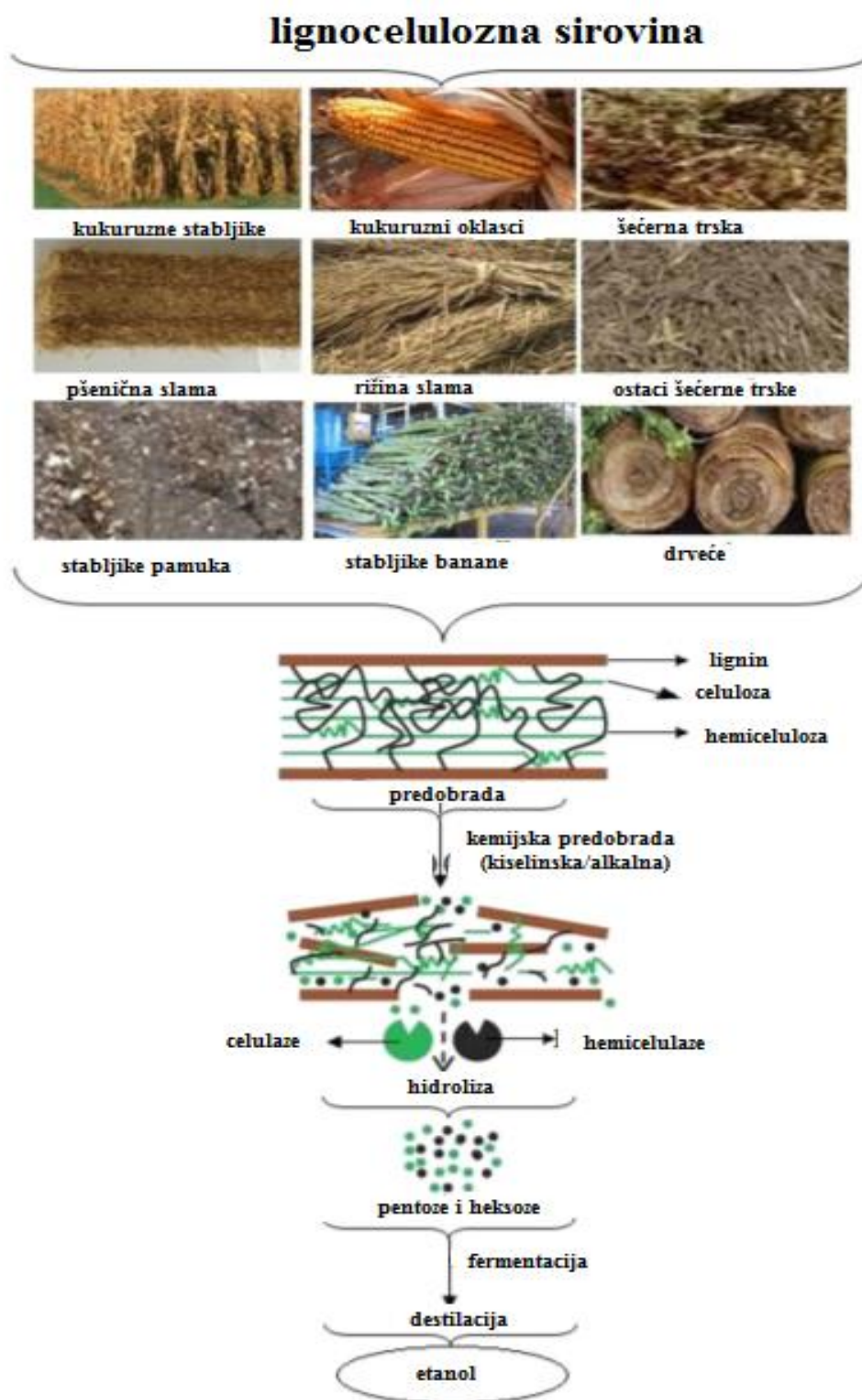


Slika 1. Građa lignocelulozne sirovine (Menon i Rao, 2012).

2.3. BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA BIOETANOLA

Etanol proizveden iz lignocelulozne biomase spada u drugu generaciju biogoriva. Zbog složenosti procesa proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina cijena gotovog proizvoda još uvijek je veća od cijene etanola dobivenog iz šećerne trske, šećerne repe ili kukuruza. Ukupnim troškovima proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina najviše pridonose cijena i transport sirovina do proizvodnog pogona, odnosno troškovi proizvodnje enzima za hidrolizu lignoceluloznih sirovina (Rezić i sur., 2016). Bioproces proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina objedinjava sljedeće operacije: odabir i kontrola kvalitete sirovina; predobrada sirovina (predtretman); enzimaska hidroliza sirovina (saharifikacija);

detoksifikacija; izbor mikroorganizma; bioproces u bioreaktoru (fermentacija); izdvajanje i pročišćavanje proizvoda (destilacija, rektifikacija, dehidratacija) (Slika 2.).



Slika 2. Shema proizvodnje bioetanola na lignoceluloznim sirovinama (Asgher i sur., 2014).

2.3.1. Predobrada lignocelulozne sirovine

Zbog kompleksnog sastava lignoceluloznih sirovina prethodno je potrebno provesti odgovarajući proces predobrade kako bi se mogla izvesti učinkovita enzimaska hidroliza. Glavni zadatak postupka predobrade je izdvajanje lignina, djelomična ili potpuna hidroliza hemiceluloze i razbijanje kristalične strukture celuloze s ciljem povećanja dostupnosti celuloze enzimima. Prinos hidrolize celuloze je manji od 20 % teorijskog prinosa ukoliko proces predobrade nije izveden. Nakon provedenog procesa preobrade prinos dostiže 90 % teorijskog (Cordona i Sánchez, 2008). Proces predobrade predstavlja 33 % od ukupnog troška cijelog procesa proizvodnje što ukazuje na važnost razvijanja različitih metoda predobrade kako bi se smanjila cijena cijelog procesa proizvodnje bioetanol. Tijekom posljednjih godina razvijen je velik broj postupaka koji se primjenjuju u prethodnoj obradi lignocelulozne sirovine: fizikalni (mehaničko usitnjavanje, piroliza, zračenje gama zrakama, ekstruzija, ekspanzija, tretman parom), fizikalno – kemijski (autohidroliza, eksplozija vlakana s amonijakom, CO₂ ili parom), kemijski (ozonoliza, kiselinska hidroliza (fosforna, sumporna, klorovodična, dušična kiselina), alkalna hidroliza (natrijev ili kalijev hidroksid), ekstrakcija otapalima, oksidativna delignifikacija) i biološki (mikroorganizmi i enzimi). Međutim, neke od navedenih metoda još uvijek nisu ekonomski isplative ili tehnički izvedive u velikom mjerilu.

Primjenom fizikalnih metoda predobrade povećava se površina lignoceluloznih sirovina, djelomično ili potpuno hidrolizira hemiceluloza te smanjuje kristaličnost celuloze. Nedostatci fizikalnih metoda predobrade su slabo izdvajanje lignina te velika potrošnja energije.

Kemijske metode predobrade lignoceluloznih sirovina također osiguravaju povećanje površine i pora sirovine, smanjuju stupanj polimerizacije, djelomično ili potpuno hidroliziraju hemicelulozu te djelomično razgrađuju lignin. Zbog povoljne cijene anorganskih kiselina, za proces proizvodnje bioetanol najčešće se primjenjuje postupak predobrade razrijeđenim ili koncentriranim kiselinama. Postupak predobrade koncentriranim kiselinama provodi se na sobnoj temperaturi pri čemu se hidrolizira do 90 % suhe tvari sirovine. Međutim, za regeneraciju i reciklaciju kiseline potrebno je utrošiti relativno veliku količinu energije i vremena, a kapitalni troškovi opreme su također visoki (oprema je izložena ubrzanoj koroziji zbog djelovanja kiselina, Rezić i sur., 2016). Osim toga, uporaba koncentriranih kiselina

rezultira razvojem toksičnih spojeva tj. inhibitora hidrolize i procesa fermentacije u odnosu na uporabu razrijeđenih kiselina. Zbog navedenih nedostataka mnogo je popularnija uporaba razrijeđenih kiselina, osobito u industrijskom mjerilu. Ova metoda se može provesti na višoj temperaturi (180 °C) u kraćem razdoblju ili na nešto nižoj temperaturi (120 °C) kroz duže razdoblje (30-90 min). Predobrada razrijeđenim kiselinama također se može provesti kombinacijom visoke i niske temperature. Kombinacijom se postiže da niže temperature sprječavaju nastanak furana i organskih kiselina (octena, mravlja, levulinska kiselina), dok više temperature omogućavaju veću dostupnost celuloze enzimima (Cordona i Sánchez, 2008).

Primjenom različitih bioloških metoda predobrade smanjuje se udjel lignina, djelomično se hidrolizira celuloza i smanjuje stupanj polimerizacije. Prednosti bioloških metoda su mali utrošak energije te učinkovita hidroliza. U biološkoj predobradi koriste se različite vrste gljiva i bakterija čijim rastom na lignoceluloznom supstratu dolazi do razgradnje lignina i hemiceluloze.

2.3.2. Enzimska hidroliza lignocelulozne sirovine

Nakon predobrade, s ciljem oslobađanja fermentabilnih šećera iz celuloze i hemiceluloze, najčešće se koristi enzimska hidroliza lignoceluloznih sirovina koja se provodi uz pomoć celulolitičkih enzima. Za razliku od kemijske hidrolize s kiselinama, enzimska hidroliza se provodi u umjerenim uvjetima (temperatura, tlak), pri kojima ne nastaju nusproizvodi koji imaju toksično djelovanje na radni mikroorganizam, te su ekološki prihvatljiviji. Glavni nedostatak enzimске hidrolize su visoke cijene enzima i potreba za održavanjem sterilnih uvjeta (Hu i sur., 2010). Celulaze su visoko specifični enzimi koji hidroliziraju β -1,4 - glikozidnu vezu u celulozi pri čemu kao produkt hidrolize nastaje glukoza. Skupinu celulaza čine tri vrste enzima: 1,4- β -D-glukan-4-glukanohidrolaze (EC 3.2.1.4.), egzoglukanaze koje uključuju 1,4- β -D-glukan-glukanohidrolaze (celodekstrinaze) (EC 3.2.1.74.) i 1,4- β -D-glukan-celobiohidrolaze (celobiohidrolaze, EC 3.2.1.91.) i β -glukozidaza (EC 3.2.1.21.). Endoglukanaze nasumično cijepaju amorfnu područja celuloznog lanca oslobađajući oligosaharide. Egzoglukanaze djeluju na reducirajuće i nereducirajuće krajeve polisaharidnog lanca, pri čemu nastaje glukoza (glukanohidrolaze) i celobioza (celobiohidrolaze). β -glukozidaze hidroliziraju topljivi celodekstrin i celobiozu do glukoze (Ivančić Šantek i sur., 2016).

2.3.3. Mikroorganizmi u proizvodnji bioetanola

U komercijalnoj proizvodnji bioetanola najčešće se koristi kvasac *Saccharomyces cerevisiae* zbog visokog prinosa etanola, visoke produktivnosti te sposobnosti rasta pri visokim koncentracijama šećera i etanola (Kang i Appels, 2014; Ivančić Šantek i sur., 2016). Jedan od glavnih problema u proizvodnji bioetanola iz lignoceluloznih sirovina je što kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ima mogućnost fermentacije samo određenih monosaharida i disaharida kao što su glukoza, fruktoza, maltoza i saharoza, odnosno nema mogućnost direktne asimilacije celuloze i hemiceluloze. Nadalje, pentoze dobivene tijekom hidrolize hemiceluloze (uglavnom ksiloza) kvasac *S. cerevisiae* ne može asimilirati (Sánchez i Cordona, 2008). Provedena su mnoga istraživanja u svrhu optimizacije proizvodnje bioetanola sa više obećavajućim kvascima i bakterijama kao radnim mikroorganizmima. Bakterija *Zymomonas mobilis* ima sposobnost rasta pri višim koncentracijama etanola (do 16 % v/v) te kiselina i šećera, tipičnim inhibitorima prisutnima u hidrolizatu biomase što čini ovu bakteriju vrlo popularnom za industrijsku primjenu (Kang i Appels, 2014). Također, postiže se veća brzina fermentacije s *Zymomonas mobilis* u usporedbi s kvascem *Saccharomyces cerevisiae*. Međutim, unatoč svim prednostima bakterije *Zymomonas mobilis* pred kvascem *S. cerevisiae* bakterija, isto kao i kvasac, nema sposobnost korištenja pentoza odnosno ne može metabolizirati C5 – šećere kao što su ksiloza i arabinoza, važne komponente lignoceluloznog hidrolizata (Kang i Apples, 2014). Jedan od načina prevladavanja navedenog problema je korištenje DNA – tehnologije odnosno metoda genetičkog inženjerstva (Sánchez i Cordona, 2008). Drugi način rješavanja problema je korištenje ko-kulture dvije različite vrste kvasaca (Azhar i sur., 2017). Genetički modificirane vrste kvasaca koriste se za simultanu fermentaciju pentoza i heksoza do etanola. Razvijaju se fuzijom protoplasta kvasca *S. cerevisiae* i kvasca koji ima sposobnost fermentacije ksiloze kao što je *P. tannophilus*, *C. shehatae* i *P. stipitis* (Kumari i Pramanik, 2013). Geni za enzime, ksiloza reduktaza i ksilitol dehidrogenaza, iz *P. stipitis* inserirani su u kvasac *S. cerevisiae* kako bi se razvila vrsta kvasca koja ima sposobnost fermentacije ksiloze. Tako genetički modificirana vrsta kvasca ima sposobnost konverzije celuloze do etanola mnogo brže u usporedbi sa nemedificiranim odnosno divljim sojem kvasca (Azhar i sur., 2017).

2.3.4. Tehnike vođenja procesa proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina

Za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina primjenjuju se različiti načini provođenja bioprocasa u bioreaktoru: odvojena hidroliza i fermentacija, simultana hidroliza i fermentacija i visoko integrirani bioproceni sustav.

2.3.4.1. Odvojena hidroliza i fermentacija (eng. Separate Hydrolysis and Fermentation - SHF)

Uobičajena konfiguracija bioprocasa koja se koristi za fermentaciju hidrolizata predobrađene lignocelulozne sirovine je dvostupanjski proces odnosno proces u kojem se hidroliza celuloze i fermentacija vrše odvojeno. U prvom stupnju predobrađena lignocelulozna sirovina podvrgava se enzimskoj hidrolizi korištenjem celulolitičkih enzima (endo- i egzoglukanaza, β -glikozidaza), a fermentacija heksoza u tekućoj fazi provodi se u drugom stupnju korištenjem konvencionalnih kvasaca (Rezić i sur., 2016). Optimalne vrijednosti parametara bioprocasa ovise o: vrsti sirovine, provedenom postupku predobrade, korištenim enzimima, osobinama radnog mikroorganizma i konstrukcijskim osobinama bioreaktora (Tahezadeh i Karimi, 2007; Limayem i Rickie, 2012). Glavna prednost dvostupanjskog procesa je što se svaki korak odnosno i hidrolize i fermentacije može voditi u optimalnim uvjetima s obzirom da se bioproceni provodi u odvojenim bioreaktorima (Tahezadeh i Karimi, 2007). Nedostatak procesa je nakupljanje produkata hidrolize koji uzrokuju inhibiciju povratnom spregom (eng. feedback inhibition) te mogućnost kontaminacije ukoliko proces hidrolize traje duži vremenski period.

2.3.4.2. Simultana hidroliza i fermentacija (eng. Simultaneous Saccharification and Fermentation - SSF)

SSF proces se intenzivo proučava s ciljem smanjenja inhibicije produkata hidrolize. Naime, u ovom procesu celulaze i mikroorganizmi dodaju se u isti bioreaktor, te tako stanice radnog mikroorganizma mogu metabolizirati glukozu koja nastaje tijekom hidrolize celuloze. Na taj način sprječava se inhibitorno djelovanje šećera na celulaze. Za odvijanje SSF procesa neophodno je korištenje razrijeđenog medija kako bi se postigla odgovarajuća reološka svojstva

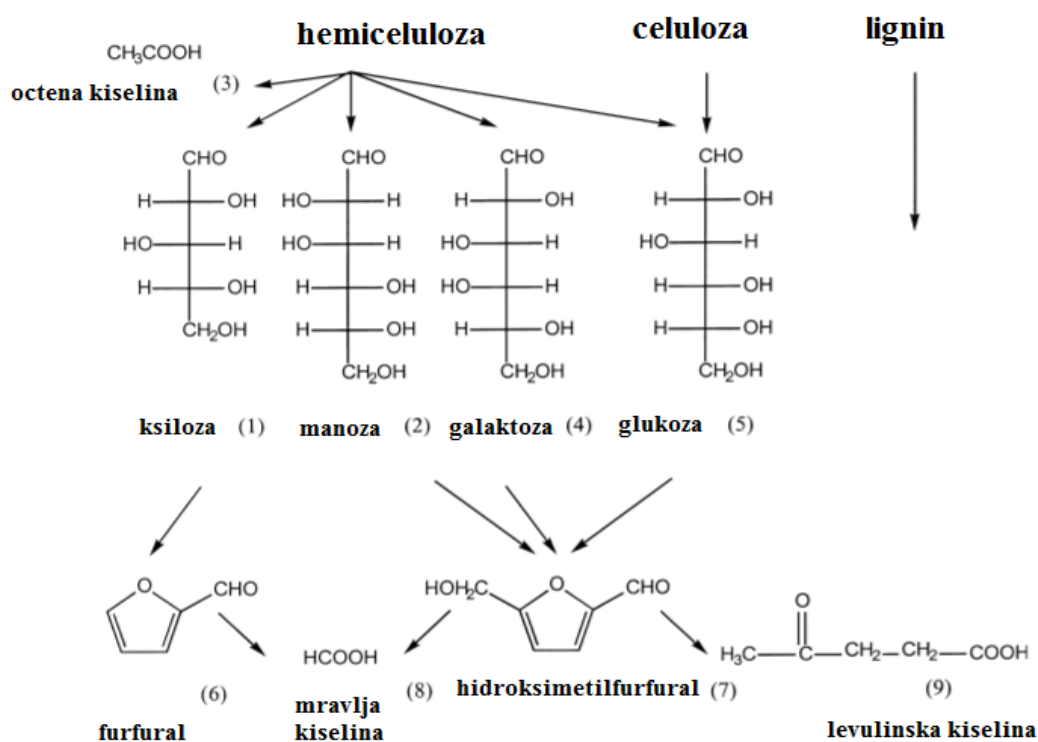
što rezultira time da je koncentracija finalnog proizvoda niska. Budući da se bioprocesi vode kod nižih temperatura od optimalne temperature za aktivnost celulolitičkih enzima potrebno je primijeniti veće količine enzima za ošćenje sirovine što poskupljuje proces proizvodnje (Rezić i sur., 2016).

2.3.4.3. Visoko integrirani bioproceni sustav (eng. Consolidated Bioprocessing, CBP)

Visoko integrirani bioproceni sustav je sustav u kojem se produkcija celulaza, hidroliza supstrata i fermentacija provode u jednom stupnju. U tu svrhu može se koristiti čista kultura ili mješovita kultura mikroorganizama. Međutim, još uvijek nije pronađen mikroorganizam pogodan za primjenu u ovom sustavu proizvodnje. Primjenom tehnika genetičkog inženjerstva nastoje se konstruirati sojevi kvasca *S. cerevisiae* s velikom celulolitičkom aktivnošću uz istovremenu konverziju dobivenih šećera u etanol (Ivančić Šantek i sur., 2016).

2.4. NASTANAK INHIBITORA TIJEKOM PROCESA PREDOBRADE LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Tijekom procesa predobrade, kako bi se kasnije postigla dobra enzimaska razgradnja celuloze, koriste se ekstremni uvjeti kao što su povišene temperature i tlakovi, s ciljem uklanjanja hemiceluloze i lignina iz lignoceluloznog materijala (Jönsson i sur., 2016). S visokim stupnjem topivosti razgradnje hemiceluloze (manjim dijelom i celuloze) i lignina dolazi do daljnje degradacije ovih produkata pod utjecajem ekstremnih uvjeta u kojima se vodi proces predobrade (Jönsson i Martín, 2015). Količina i svojstva nastalih spojeva, od kojih mnogi imaju inhibitorni učinak na aktivnost enzima i radni mikroorganizam, ovisi o odabranoj metodi, uvjetima predobrade, kao i sastavu lignocelulozne sirovine (Jönsson i Martín, 2015; Olsson i Hahn–Hägerdal, 1996; Jiang i sur., 2016). Komponente koje se mogu ponašati kao inhibitori mikroorganizama uključuju fenolne i aromatske komponente, alifatske kiseline, furan aldehide, alkohole i druge produkte fermentacije (Jönsson i sur., 2016). Proces predobrade kiselinama, koji uključuje ekstremne temperature, rezultira nastajanjem i oslobađanjem velikog broja komponenata koje mogu djelovati inhibirajuće (Palmqvist i sur., 2000) (Slika 3.)



Slika 3. Inhibitori koji nastaju tijekom hidrolize lignoceluloznih sirovina (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000).

Razgradnjom hemiceluloze oslobađaju se monomerne jedinice ksiloze, manoze, glukoze, galaktoza i octena kiselina. Pri visokim temperaturama i tlakovima ksiloza se dalje razgrađuje do furfurala. Slično, nastaje i 5-hidroksimetilfurfural (HMF) degradacijom heksoza (Palmqvist i sur., 2000). Furfural i HMF djeluju na način da inhibiraju rast stanice i prinos etanola (Ask i sur., 2013). Furan aldehidi inhibiraju metabolizam kvasca redukcijom enzimske i biološke aktivnosti uzrokujući oksidativna oštećenja stanice (Allen i sur., 2010; Modig i sur., 2002; Sanchez i Bautista, 1998). Octena kiselina ne nastaje degradacijom šećera nego je rezultat hidrolize acetilnih grupa hemiceluloze (Jönsson i sur., 2016). Pod utjecajem ekstremnih uvjeta, kao što su visoke temperature i duže vrijeme zadržavanja, tijekom provođenja predobrade, HMF se dalje degradira do levulinske i mravlje kiseline (Jönsson i sur., 2016; Fengel i Wegener, 1989). Isto kao i HMF, furfural je također podložan daljnjoj razgradnji do mravlje kiseline (Danon i sur., 2013). Fenolni spojevi uglavnom nastaju iz lignina tijekom hidrolize lignocelulozne sirovine (Jiang i sur., 2016). Utjecaj fenolnih i drugih aromatskih komponenata,

koji mogu inhibirati rast stanice kvasca i smanjiti prinos proizvoda odnosno etanola, je različit i ovisan o specifičnoj funkcionalnoj grupi. Jedan od mogućih mehanizama je da fenolne komponente interferiraju sa staničnom membranom i mjenjaju omjer lipida i proteina u membrani (Keweloh i sur., 1999). Osim toga, kvasac *S. cerevisiae* može konvertirati neke inhibitore do manje toksičnih komponenata, kao npr. do koniferil alkohola koje može reducirati do koniferil alkohola i dihidrokoniferil alkohola (Larsson i sur., 2000). Inhibitorni učinak također imaju i različite anorganske komponente koje mogu biti prisutne u lignoceluloznom hidrolizatu a potječu od lignocelulozne sirovine, kemikalija koje su korištene tijekom provođenja predobrade, sa procesne opreme ili su rezultat ekstremnih uvjeta hidrolize (Jönsson i sur., 2013). Prisutnost anorganskih komponenata rezultira većim osmotskim tlakom što djeluje inhibitorno na radni mikroorganizam (Wadskog i Adler; 2003; Helle i sur., 2003).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovina

Lignocelulozna sirovina korištena za izradu ovog diplomskog rada bila je pšenična slama s 92,8 % suhe tvari, podrijetlom iz Hrvatskog Zagorja (Slika 4.). U ovom istraživanju određen je sastav sirovina prije i poslije procesa njihove predobrade u visokotlačnom reaktoru.



Slika 4. Pšenična slama usitnjena mlinom čekičarom.

3.1.2. Kemikalije

Tablica 1. Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripremu otopina i standarda korištenih u eksperimentima.

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
celobioza	p.a.	Molekula, UK
D-(+)-glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
D-(+)-ksiloza	≥ 99%, za biokemiju	Roth, Njemačka
L-(+)-arabinoza	za mikrobiologiju	Kemika, Hrvatska
levulinska kiselina	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
octena kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
mravlja kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
furfural	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
demineralizirana voda	p.a.	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
fosforna kiselina	p.a., za HPLC	Fluka, Njemačka
fosforna kiselina	85%, p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcijev hidroksid	p.a.	Kemika, Hrvatska
sumporna kiselina	min 96 %, p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcijev hidroksid	50 %, tehnički	Proizvodnja gašenog vapna, Hrvatska
natrijeva lužina	p.a.	Kemika, Hrvatska
diamonijev fosfat (DAP)	p.a.	Kemika
diamonijev sulfat (DAS)	p.a.	Kemika
kvašičev ekstrakt	p.a.	Merck
etanol	p.a.	Gram-Mol d.o.o. Hrvatska

3.1.3. Radni mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam korištena su dva različita soja kvasca: divlji soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* te genetički modificirani soj kvasca *Saccharomcey cerevisiae*, soj Y9 iz zbirka mikroorganizama Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.4. Hranjive podloge

Sastavi hranjivih podloga korištenih u ovom istraživanju opisani su u daljnjem tekstu te su prikazani u obliku tablica (Tablica 2., Tablica 3.). Uz sastav naveden u tablicama, u svaku su podlogu naknadno dodane hranjive soli diamonijev fosfat i diamonijev sulfat, kao izvori dušika i fosfora. Osim soli, dodan je i kvašćev ekstrakt kao izvor aminokiselina, vitamina i ugljikohidrata.

3.1.4.1. Hranjiva podloga za održavanje čiste kulture kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Čista kultura divljeg soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i genetički modificiranog kvasca *Saccharomyces cerevisie* Y9 održavana je na koso sladnom agaru koji se priprema dodatkom 20 gL⁻¹ agara sladovini.

3.1.4.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama

Sastav podloga korištenih za uzgoj inokuluma naveden je u tablici 2., dok su sastavi kontrolnih podloga navedeni u tablici 3.. Za uzgoj genetički modificiranog soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y9 korištene su kontrolne podloge koje su sadržavale glukozu i ksilozu (kontrolna podloga 1), odnosno samo ksilozu (kontrolna podloga 2) kao izvore ugljika.

Tablica 2. Sastav hranjive podloge za uzgoj inokuluma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (divlji soj i genetički modificirani kvasac *S. cerevisiae* Y9).

Podloga (sastav)	Podloga za inokulum
Glukoza (gL ⁻¹)	15
Diamonijev fosfat (DAP) (gL ⁻¹)	1
Diamonijev sulfat (DAS) (gL ⁻¹)	1
Kvaščevev ekstrakt (gL ⁻¹)	1,5

Tablica 3. Sastav kontrolnih hranjivih podloga za uzgoj genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 (kontrolna podloga 1, kontrolna podloga 2).

Podloga (sastav)	Kontrolna podloga 1	Kontrolna podloga 2
Glukoza (gL ⁻¹)	10	0
Ksilozna (gL ⁻¹)	10	10
Diamonijev fosfat (DAP) (gL ⁻¹)	1	1
Diamonijev sulfat (DAS) (gL ⁻¹)	1	1
Kvaščevev ekstrakt (gL ⁻¹)	1,5	1,5

Kao hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (divlji tip i soj Y9) u Erlenmeyer tikvicama korišteni su hidrolizati pšenične slame dobiveni različitim postupcima predobrade pšenične slame. Hidrolizatima pšenične slame dodane su soli diamonijev fosfat i diamonijev sulfat u koncentracijama od 1 gL⁻¹, te kvaščevev ekstrakt u koncentraciji od 1,5 gL⁻¹. Sastav hidrolizata pšenične slame korištenih za uzgoj divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* prikazani su u tablici 4., dok su sastavi hidrolizata pšenične slame korištenih za uzgoj genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae*, soj Y9 prikazani u tablici 5.

Tablica 4. Sastav pšenične slame (PS) dobivene predobradom pomoću fosforne kiseline pri uvjetima temperature od 180 °C i 200 °C i vremenu zadržavanja od 1 min i 5 min u visokotlačnom reaktoru.

Uvjeti predobrade	γ glukoza [gL ⁻¹]	γ ksiloza [gL ⁻¹]	γ arabinoza [gL ⁻¹]	γ furani [gL ⁻¹]	γ mravlja kiselina [gL ⁻¹]	γ octena kiselina [g ^l -1]	γ levulinska kiselina [gL ⁻¹]
PS/180 °C/1 min/2,0 % H ₃ PO ₄	3,86	9,24	1,69	0,37	0,95	1,03	0,00
PS/200 °C/5 min/2,0 % H ₃ PO ₄	5,55	2,96	0,62	0,85	1,11	0,82	0,16

*PS – pšenična slama (izražena kao suha tvar)

Tablica 5. Sastav pšenične slame (PS) dobivene predobradom pomoću fosforne kiseline pri uvjetima temperature od 160 °C do 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min i 10 min.

Uvjeti predobrade	γ glukoza [gL ⁻¹]	γ ksiloza [gL ⁻¹]	γ arabinoza [gL ⁻¹]	γ furani [gL ⁻¹]	γ mravlja kiselina [gL ⁻¹]	γ octena kiselina [g ^l -1]	γ levulinska kiselina [gL ⁻¹]
PS/160 °C/5 min/2,0 % H ₃ PO ₄	2,35	9,07	1,65	0,14	0,72	0,76	0,00
PS/200 °C/5 min/2,0 % H ₃ PO ₄	5,55	2,96	0,62	0,85	1,11	0,82	0,16
PS/160 °C/10 min/2,0 % H ₃ PO ₄	3,75	6,08	1,24	0,052	0,83	0,73	0,00
PS/180 °C/10 min/2,0 % H ₃ PO ₄	4,23	8,00	1,52	0,39	1,02	1,03	0,00
PS/200 °C/10 min/2,0 % H ₃ PO ₄	4,09	3,12	0,56	1,03	0,86	0,98	0,13

*PS – pšenična slama (izražena kao suha tvar)

3.1.4.3. Hranjiva podloga za uzgoj genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae*, soy Y u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору (HRCB-u)

Kao hranjiva podloga za uzgoj genetički modificiranog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y9 u HRCB-u korišten je hidrolizat pšenične slame predobrađen pri uvjetima temperature od 180 °C, vremenu zadržavanja od 10 min i koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 %. Sastav dobivenog hidrolizata pšenične slame bio je: glukoza: 4,23 gL⁻¹, ksiloza: 8,00 gL⁻¹, arabinoza: 1,52 gL⁻¹, mravlja kiselina: 1,02 gL⁻¹, octena kiselina: 1,03 gL⁻¹, levulinska kiselina: 0,00 gL⁻¹, furfural: 393,03 mgL⁻¹ uz dodatak glukoze u koncentraciji od 10 gL⁻¹, soli diamonijev fosfat (DAP) i diamonijev sulfat (DAS) u koncentracijama od 2 gL⁻¹ te kvašćevog ekstrakta u koncentraciji od 1,5 gL⁻¹.

3.1.5. Aparature i uređaji

3.1.5.1. Mlin čekičar

Za usitnjavanje lignocelulozne sirovine (pšenična slama) korišten je mlin čekičar – tip NA45. Mlin pokreće trofazni motor (Slika 5.). Kapacitet mljevenja u zrnu iznosi 300 kg h^{-1} dok kapacitet mljevenja u klipju iznosi 250 kg h^{-1} . Ovaj mlin ima dvije vrste sita koja su veličine 12 i 5 mm. Za usitnjavanje pšenične slame tijekom izrade ovog diplomskog rada korišteno je sito veličine 5 mm.

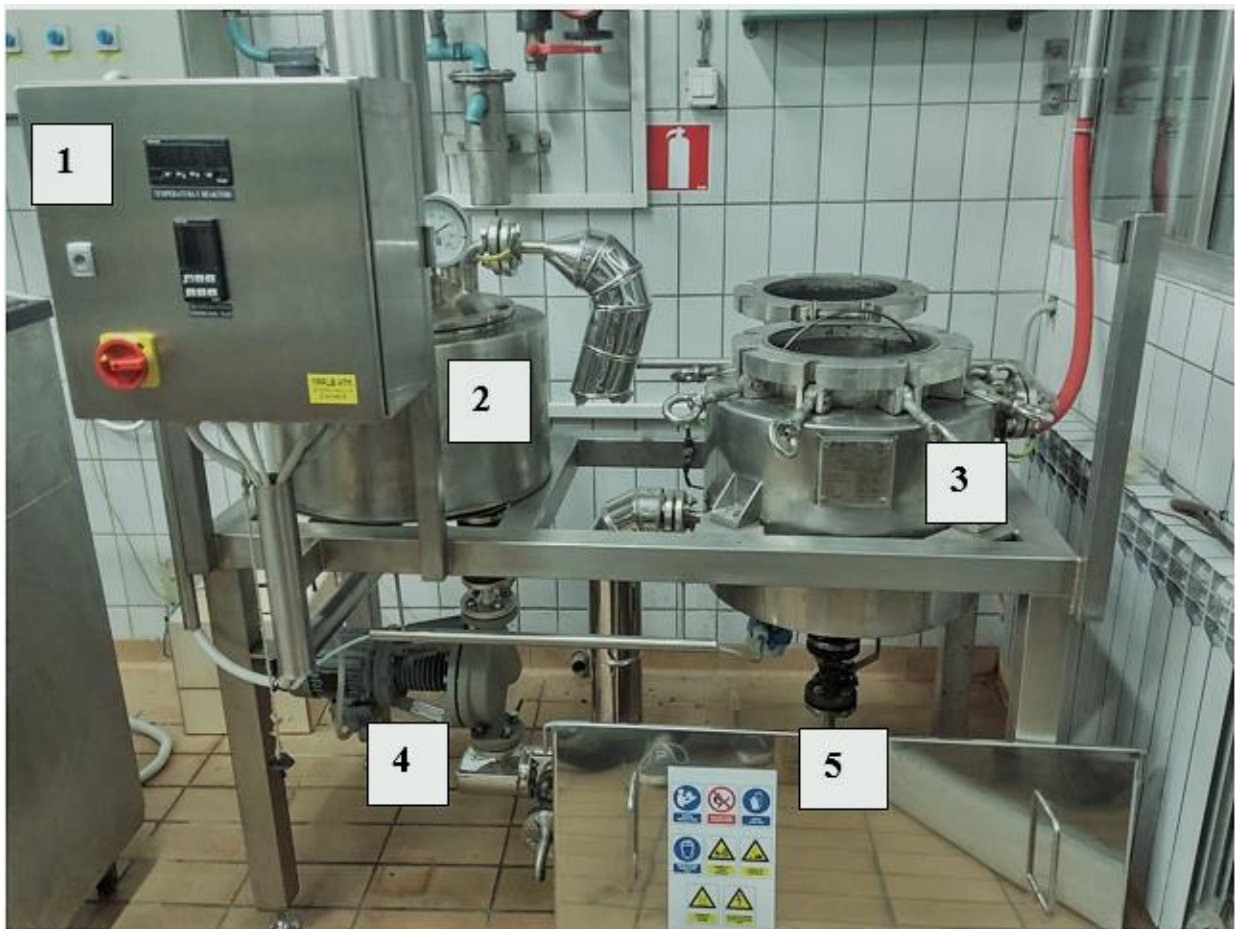


Slika 5. Mlin čekičar – tip NA45 (Megameta d.o.o., Nedelišće, Hrvatska).

3.1.5.2. Visokotlačni reaktor

Sirovina (pšenična slama; 500 g suhe tvari) stavlja se u metalnu perforiranu košaru koja se nalazi u reaktoru zapremnine 20 litara. Potom se ulijeva 10 litara fosforne kiseline ($w_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 \%$) i sadržaj se pomiješa. Nakon toga se reaktor, prikazan na slici 6., zatvara. Nakon zatvaranja reaktora uključuje se sustav na kontrolnoj jedinici, čime započinje

grijanje spremnika koji sadrži termičko ulje. Termičko ulje se grije u drugoj reaktorskoj posudi preko 3 električna grijača snage 1,0 kW dok se reaktor za predobradu sirovine grije vrućim termičkim uljem preko plašta. Uključivanjem sustava uključuje se i integrirana pumpa koja omogućuje cirkulaciju termičkog ulja kroz cijeli sustav uz jednolično zagrijavanje smjese preko plašta reaktora. Nadzor procesa provodi se mjerenjem temperature ulja, temperature tekućeg dijela i temperature pare nastale tijekom zagrijavanja i tlaka u reaktoru sa sirovinom. Kada se postignu zadani uvjeti temperature i tlaka pare u reaktoru, započinje mjerenje vremena zadržavanja pri željenoj temperaturi. Nakon završetka procesa pomoću ventila s gornje strane uređaja, koji služi za otpuštanje pare, spušta se tlak na atmosferski. Kada se tlak u reaktoru izjednači s atmosferskim tlakom tekući dio se ispušta otvaranjem ventila na dnu reaktora (ispust), a kruti dio zaostaje u perforiranoj posudi od nehrđajućeg čelika te se može izvaditi otvaranjem poklopca reaktora.



Slika 6. Visokotlačni reaktor (1-kontrolna jedinica; 2-posuda sa termičkim uljem i grijačima; 3-reaktor za predobradu sirovine; 4 – pumpa; 5 – ispust tekućeg dijela).

3.1.5.3. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)

HPLC (Slika 7.) je uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (Shimadzu CLASS – VP LC10A_{VP}, Shimadzu, Kyoto, Japan). Uređaj se sastoji od crpke (LC-10A_{VP}), otplinjača (DGU -14A), automatskog uzorkivača i injektora (SIL – 10 A_{VP}), uređaja za grijanje kolone (CTO – 10A_{VP}), analitičke kolone (ionsko – izmjenjivačka kolona Supelcogel H Guard Column, Sigma; Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9μM s predkolonom Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm), detektora indeksa loma (RID – 10A), modula za kontrolu sustava (SCL – 10 A_{VP}) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).



Slika 7. HPLC- Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustav (Japan).

3.1.5.4. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)

Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB, Slika 8.) korišten je za provođenje procesa proizvodnje bioetanol na tekućem dijelu odnosno hidrolizatu predobrađene pšenične slame. HRCB je cilindrična posuda izrađena od nehrđajućeg čelika opremljena sustavom za praćenje temperature i tlaka te sustavom za regulaciju rotacije, ukupnog volumena 30 L. Sterilizacija HRCB-a vrši se direktno parom. Ovaj bioreaktorski sustav sastoji se od nosača, bioreaktora izrađenog od nehrđajućeg čelika, elektromotora i kontrolne jedinice. Nosač

bioreaktora podupire posudu bioreaktora čime omogućava njenu rotaciju preko osovine koju pokreće elektromotor. Kontrolna jedinica omogućuje regulaciju broja okretaja bioreaktora (n) i intervalno uključivanje/isključivanje rotacije. Bioreaktor se rotira pomoću elektromotora snage 0,9 kW. Bioreaktor ima ugrađena dva lopatasta mješala duljine 0,6 m i širine 0,04 m učvršćena na unutrašnju stijenku HRCB-a. Bioreaktor ima dva mjesta za uzimanje uzoraka tj. za uzimanje uzoraka tekuće faze odnosno za uzimanje uzoraka čvrste faze.



Slika 8. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (Rosing d.o.o., Hrvatska).

3.1.5.5. Ostala oprema

Uz laboratorijsko posuđe i potrošni laboratorijski materijal u izradi ovoga diplomskog rada korištena je i oprema navedena u tablici 6.

Tablica 6. Popis uređaja i proizvođača korištenih u izradi ovoga rada

OPREMA	PROIZVOĐAČ
Centrifuga	Harrier 18/80, Sanyo, Velika Britanija ThermoScientific, SL 8R, SAD
Autoklav	Sutjeska, Beograd, Jugoslavija
Tresilica	RM 71 B. Braum Biotech. International, Sartorius group, Njemačka
Sušionik	Instrumentaria ST – 50, Hrvatska
Tehnička vaga	Technica ET – 1111, Slovenija
Analitička vaga	Sartorius, Njemačka
Vrtložna mješalica	Technica ET – 1111, Slovenija
UV/Vis spektrofotometar	Cary 13 E Varian, Mulgrave, Australija
Kvarcne kivete promjera 10 mm	Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka
Oprema za filtraciju otopina	najlonski filter (0,22 μm , 47 mm; Magna, GE Water & Process Technologies, Michigan, SAD
Mikroskop	Olympus CH20, Tokyo, Japan
Mlinac za kavu SCG 3050SS	Sencor, Japan
Hladnjak i zamrzivač	Bosch, Njemačka
Ultrazvučna kupelj USC300T	VWR International, Leuven, Belgija)
Staklene kivete promjera 10 mm	Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka

3.2.METODE

3.2.1. Održavanje čiste kulture i uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1.1. Održavanje čiste kulture

Čista kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae* održavana je na kosoj hranjivoj podlozi. Nakon naciepljivanja kultura je uzgajana na 28 °C kroz 2 -3 dana te je čuvana u hladnjaku na + 4 °C.

3.2.1.2. Uzgoj inokuluma

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* je s kose hranjive podloge prebačen u epruvete koje su sadržavale 10 mL tekuće sterilne podloge sljedećeg sastava: glukoza: 20 gL⁻¹; kvašćev ekstrakt: 5 gL⁻¹; demineralizirana voda. Nakon inkubacije u termostatu pri 28 °C kroz 24 sata cjepivo je prebačeno u Erlenmeyerove tikvice od 500 ml koje su sadržavale po 250 ml podloge čiji sastav je opisan u poglavlju 3.1.4.2, (Tablica 2). Inokulum je uzgajan na rotacionoj tresilici (150 okretaja min⁻¹) kroz 24 sata pri temperaturi od 30 °C. Tako pripremljena kultura kvasca poslužila je kao inokulum za daljnje eksperimente anaerobnog uzgoja kvasca.

3.2.2. Određivanje sastava pšenične slame korištene za preobradu u visokotlačnom reaktoru

Sastav pšenične slame određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Priprema uzoraka i postupak dvostupanjske kiselinske hidrolize opisan je u poglavlju 3.2.3. Sastav pšenične slame korištene tijekom provedenih eksperimenata prikazan je u tablici 9. (poglavlje 4.1.).

3.2.3. Kiselinska predobrada lignocelulozne sirovine

Prethodno usitnjena pšenična slama je predobrađena fosfornom kiselinom (0,5 -2,0 %) pri različitim temperaturama (160 °C, 180 °C i 200 °C) i različitim vremenima zadržavanja (1, 5, 10 minuta). Izvagano je 500 g suhe tvari sirovine odnosno usitnjene pšenične slame što uz postotak vlage od 7,2 % iznosi 538,4 g pšenične slame. Slama je prebačena u visokotlačni reaktor za predobradu te je dodano 10 L otopine fosforne kiseline. Otopine fosforne kiseline ($\text{WH}_3\text{PO}_4 = 0,5 \%$; $1,00 \%$; $1,5, 2,0 \%$) prethodno su pripremljene tako da je odgovarajući, prethodno izračunati volumen 85 %-tne fosforne kiseline (34,4 ml; 68,8 ml; 103,2 ml; 137,6 ml) dodan u vodovodnu vodu na način da konačni volumen otopine fosforne kiseline iznosi 10 L. Početni omjer tekućeg dijela (otopina fosforne kiseline) i čvrstog dijela (pšenična slama) bio je 1:20. Predobrada je provedena na tri različite temperature (160 °C; 180 °C; 200 °C) i tri različita vremena zadržavanja (1, 5 10 min). Ulje za zagrijavanje reaktora bilo je zagrijavano u zasebnom spremniku, povezanom cijevima za visokotlačni reaktor. Vruće ulje protjecalo je kroz vanjski plašt reaktora i zagrijavalo vodu unutar reaktora do odgovarajućih temperatura (160 °C; 180 °C, 200 °C). Provedeno je 12 eksperimenata predobrade s različitim temperaturama, vremenima zadržavanja i koncentracijama fosforne kiseline (Tablica 7.). Pri temperaturi od 160 °C i koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 % provedena su 3 pokusa predobrade na način da su varirane temperature zadržavanja (1; 5; 10 min). Pri temperaturi od 180 °C provedeno je 6 pokusa predobrade gdje su se osim vremena zadržavanja (1;5;10 min) varirale i koncentracije fosforne kiseline ($\text{WH}_3\text{PO}_4 = 0,5 \%$; $1,00 \%$; $1,5, 2,0 \%$). Varijacije koncentracije fosforne kiseline i vremena zadržavanja pri temperaturi od 180 °C provedene su na način da je pri vremenu zadržavanja od 5 min provedeno 4 pokusa kiselinske predobrade koje su se međusobno razlikovale po koncentraciji fosforne kiseline. Preostala dva pokusa na 180 °C provedena su s 2,0 %-tnom otopinom fosforne kiseline uz varijacije vremena zadržavanja (1 i 10 min). Pri temperaturi od 200 °C provedene su tri pokusa predobrade. Pokusi su provedeni sa 2,0 %-tnom otopinom fosforne kiseline pri tri različita vremena zadržavanja (1; 5; 10 min). Tijekom provođenja eksperimenta procesni parametri su se mjerili pomoću ugrađenog termometra i barometra. S dosegom odgovarajuće temperature započelo je mjerenje vremena zadržavanja na određenoj temperaturi (1; 5 ; 10 min). Nakon isteka vremena zadržavanja reaktor je ugašen i tlak je spušten na atmosferski. Nakon svakog eksperimenta dobivene su dvije faze (tekuća i čvrsta) koje su zasebno analizirane. Tekuća faza je ispuštena kroz ventil na dnu posude reaktora nakon čega joj je izmjerjen volumen te je analizirana kako

je opisano u poglavlju 3.2.6.1.. Tekući dio je neutraliziran do neutralnog pH dodatkom kalcijevog hidroksida i kao takav neutralizirani hidrolizat je korišten za anaerobni uzgoj. Čvrsta faza hidrolizata zaostala je u perforiranoj unutarnjoj posudi reaktora. U čvrstom dijelu hidrolizata određen je udjel suhe tvari gravimetrijski tj. sušenjem na 60 °C do konstantne mase. Osušeni čvrsti dio hidrolizata je čuvan u u suhoj i tamnoj prostoriji na sobnoj temperaturi, a potom je pohranjen na -20 °C. U čvrstom dijelu hidrolizata pšenične slame određen je udjel ksilana, glukana i lignina topivog (LTK) i netopivog (LNTK) u kiselini.

Tablica 7. Uvjeti u visokotlačnom reaktoru pri kojima je provedena predobrada pšenične slame.

Sirovina	<i>m_{PS}</i> (g)	<i>t_{pare}</i> (°C)	<i>t_z</i> (min)	<i>V_o</i> (L)	<i>w_{H3PO4}</i> (%)	Oznaka
Pšenična slama (PS)	500	160	1	10	2,00	PS/160 °C/ 1 min/ 2,0 % H ₃ P0 ₄
	500		5	10	2,00	PS/160 °C/ 5 min/ 2,0 % H ₃ P0 ₄
	500		10	10	2,00	PS/160 °C/ 10 min/ 2,0 % H ₃ P0 ₄
	500	180	1	10	2,00	PS/180 °C/ 1 min/ 2,0 % H ₃ P0 ₄
	500		5	10	0,50	PS/180 °C/ 5 min/ 0,5 % H ₃ P0 ₄
	500		5	10	1,00	PS/180 °C/ 5 min/ 1,0 % H ₃ P0 ₄
	500		5	10	1,50	PS/180 °C/ 5 min/ 1,5 % H ₃ P0 ₄
	500		5	10	2,00	PS/180 °C/ 5 min/ 2,0 % H ₃ P0 ₄
	500		10	10	2,00	PS/180 °C/ 10 min/ 2,0 % H ₃ P0 ₄
	500	200	1	10	2,00	PS/200 °C/ 1 min/ 2,0 % H ₃ P0 ₄
	500		5	10	2,00	PS/200 °C/ 5 min/ 2,0 % H ₃ P0 ₄
	500		10	10	2,00	PS/200 °C/ 10 min/ 2,0 % H ₃ P0 ₄

**m_{PS}* – masa suhe tvari pšenične slame

3.2.4. Određivanje sastava lignocelulozne sirovine

3.2.4.1. Određivanje ukupne suhe tvari u lignoceluloznoj sirovini

Izvagano je 50 g pšenične slame koja je prebačena u Petrijevu zdjelicu kako bi se odredila ukupna suha tvar. Petrijeve zdjelice su prethodno bile osušene u sušioniku, prebačene u eksikator na hlađenje kroz 15 minuta te im je potom izmjerena masa. Uzorci u Petrijevim zdjelicama sušeni su pri temperaturi od 105 °C. Nakon 24 sata sušenja uzorci se najprije hlade na način da se stave u eksikator kroz 15 minuta te se potom ponovno izmjeri masa Petrijevih zdjelica. Razlika masa suhog uzorka i prazne Petrijeve zdjelice je ukupna masa suhe tvari. Udio suhe tvari računa se prema jednadžbi [1]:

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

3.2.4.2. Dvostupanjska kiselinska hidroliza lignocelulozne sirovine

Udjel strukturnih ugljikohidrata (glukan, ksilan, arabinan) te lignina topivog (LTK) i netopivog u kiselini (LNTK) određeni su u izvornoj (neobrađenoj) i predobrađenoj lignoceluloznoj sirovini dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom prema propisu Nacionalnog laboratorija za obnovljive izvore energije (eng. National Renewable Energy Laboratory; NREL; Sluiter i sur., 2010). U epruvetu je dodano po 0,4 g isprane i osušene sirovine (neobrađena ili predobrađena pšenična slama). Sirovinu je potrebno najprije usitniti u fini prah pomoću tarionika i mlinca za kavu. Potom se u epruvetu doda 4 ml 72 %-tne H₂SO₄ te se dobro pomiješa teflonskim ili staklenim štapićem otprilike jednu minutu dok se sadržaj epruvete dobro ne izmiješa. Sirovina se ostavlja u termostatu na 30 °C kroz jedan sat uz povremeno miješanje sadržaja kako bi se ostvario bolji kontakt lignocelulozne sirovine i kiseline te ravnomjerna hidroliza. Nakon inkubacije sadržaj iz epruvete se kvantitativno prenosi u tikvicu s okruglim dnom uz dodatak 112 ml demineralizirane vode tako da koncentracija sumporne kiseline u smjesi nakon dodatka demineralizirane vode iznosi 4 %. Potom se smjesa zagrijava do vrenja i kuha 4 sata uz povratno hladilo i povremeno miješanje kako bi se spriječilo nakupljanje sirovine na stijenkama. Nakon hidrolize uzorci su ohlađeni pod mlazom vode i filtrirani preko Büchnerovog ljevka kroz prethodno osušeni i izvagani celulozni filter papir. Zaostali talog potom je ispran s naljevima vruće vode do pH 6. Čvrsti talog zaostao na filter papiru predstavlja lignin netopiv u kiselini (LNTK) čija masa se određuje gravimetrijski. Udjel lignina topivog u

kiselini (LTK) određuje se iz filtrata nakon hidrolize spektrofotometrijski. Osim toga, u filtratu kiselinskog hidrolizata određene su koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze, celobioze, levulinske kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline i furana HPLC metodom te je izračunat udjel strukturnih ugljikohidrata glukana i ksilana kako je opisano u poglavlju 3.2.5.6. i 3.2.5.7..

3.2.4.3. Određivanje udjela lignina netopivog u kiselini (LNTK)

Lignin netopiv u kiselini (LNTK) određuje se vaganjem osušene čvrste faze koja je zaostala na filter papiru nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Čvrsti dio sirovine zaostao na filter papiru nakon kiselinske hidrolize osušen je na 105 °C do konstantne mase. Nakon sušenja, talog je izvagan i izračunat je udjel lignina netopivog u kiselini prema jednadžbi [2]

$$w \text{ (LNTK)} = \frac{m \text{ (osušeni filter s talogom)} - m \text{ (filter)}}{m \text{ (uzorka uzetog u analizu=0,4 g)}} * 100 \text{ [%]} \quad [2]$$

3.2.4.4. Određivanje udjela lignina topivog u kiselini (LTK)

Određivanje lignina topivog u kiselini provedeno je mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 205 nm u filtratu nakon dvostupanjske hidrolize čvrste faze uzorka. Provedeno je mjerenjem apsorbancije spektrofotometrom pri valnoj duljini od 205 nm. Uzorak za određivanje LTK potrebno je razrijediti demineraliziranom vodom tako da apsorbancija uzorka pri valnoj duljini od 205 nm bude u rasponu od 0,7 do 1,0 jedinica (preporučuje se pripremiti 10 X razrijeđenu otopinu uzorka). Udio lignina topivog u kiselini izračunat je prema jednadžbi [3]:

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

A= apsorbancija uzorka na 205 nm; D=faktor razrijeđenja = 10; V= volumen filtrata= 0.016 L;
a= konstanta, 110 gL⁻¹cm⁻¹; b= širina kivete, 1 cm; m = masa uzorka uzetog u analizu (0,4 g)

3.2.4.5. Određivanje inhibitora fermentacije – ukupnih furana

Furani su određivani u tekućoj fazi predobrađene lignocelulozne sirovine. Izdvojen je alikvot (5 ml) tekućeg dijela nakon završenog procesa kiselinske predobrade. Furfural i HMF nastaju dehidracijom pentozna odnosno heksoza tijekom kiselinske hidrolize lignocelulozних sirovina. Ova dva spoja imaju karakteristične spektre u području valnih duljina od 200 nm do 400 nm s maksimumom apsorpcije pri valnoj duljini svjetlosti od 284 nm (Martinez i sur., 2000). Uzorak se razrijeđuje demineraliziranom vodom 1000 puta (9 μ L uzorka se pomiješa sa 9 ml demineralizirane vode), a potom se mjeri apsorpcija pri valnim duljinama 284 nm i 320 nm. Razlika tih dvaju vrijednosti je uzeta za izračunavanje ukupnih furana. Za određivanje koncentracije furana potreban je baždarni pravac koji se prethodno pripremi određivanjem apsorpcije otopine furana poznatih koncentracija. Koncentracija ukupnih furana se određuje iz jednadžbe dobivenog baždarnog pravca ($\gamma_{\text{furfural}} = 2,496 x + 0,0158$; $R^2 = 0,998$).

3.2.4.6. Izračunavanje udjela strukturnih ugljikohidrata

Masa strukturnih ugljikohidrata (glukan, ksilan, arabinan) u lignoceluloznoj sirovini izračunata je iz mase odgovarajućih monosaharida (glukoza, ksiloza, arabinoza) u filtratu nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize uz pomoć korektivnog faktora (K_f) prema jednadžbi [4]. Korektivni faktor predstavlja omjer molekulske mase monomerne građevne jedinice ugljikohidrata i monosaharida. Korektivni faktor za pentoze (ksiloza, arabinoza) iznosi 0,88 (tj. $132 \text{ gmol}^{-1}/150 \text{ gmol}^{-1}$), dok za heksoze (glukoza, galaktoza, manozna) iznosi 0,9 (tj. $162 \text{ gmol}^{-1}/180 \text{ gmol}^{-1}$).

$$m_{\text{CHO}_i} = c_{\text{monosaharida}} * V_{\text{hidr}} * K_f \quad (\text{g}) \quad [4]$$

V_{hidr} = volumen hidrolizata (L); $c_{\text{monosaharida}}$ = koncentracija monosaharida u filtratu kiselinske hidrolize (gL^{-1}); K_f = korektivni faktor

Udjel strukturnih ugljikohidrata u lignoceluloznoj sirovini izračunava se prema jednadžbi [5].

$$W_{\text{CHO}i} = \frac{m_{\text{CHO}}}{m_{\text{UZ}} * w_{\text{H}_2\text{O}/x}} \quad (\text{gg}^{-1}) \quad [5]$$

w_{CHO} = udjel ugljikohidrata (%); m_{CHO} = masa ugljikohidrata u predobrađenoj lignoceluloznoj sirovini (LCS) (g); $w_{\text{H}_2\text{O},x}$ = udjel vlage u predobrađenoj LCS; m_{uz} = masa predobrađene LCS podvrgnute kiselinskoj hidrolizi (0,4 g).

3.2.4.7. Izračunavanje iskorištenja glukana, ksilana i ukupnog lignina u lignoceluloznoj sirovini

Nakon predobrade pšenične slame izračunato je iskorištenje glukana, ksilana i ukupnog lignina za svaki pojedini eksperiment predobrade prema jednadžbi [6]

$$\eta = \frac{m_{\text{FK}} * w_{\text{H}_2\text{O}/\text{FK}} * w_{\text{X}/\text{PPS}}}{m_{\text{KO}} * w_{\text{H}_2\text{O}/\text{PPS}} * w_{\text{X}/\text{PPS}}} * 100 \quad [\%] \quad [6]$$

m_{FK} = masa vlažnog filtarskog kolača (g); $w_{\text{H}_2\text{O}/\text{FK}}$ = udjel vlage u filtarskom kolaču; m_{PS} = masa pšenične slame za predobradu (g); $w_{\text{H}_2\text{O}/\text{PS}}$ = udjel vlage u pšeničnoj slami; $w_{\text{X}/\text{PS}}$ = udjel polimera (glukan, ksilan, ukupni lignin) u pšeničnoj slami; $w_{\text{X}/\text{PPS}}$ = udjel polimera (glukan, ksilan, ukupni lignin) u predobrađenoj pšeničnoj slami

3.2.5. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti analizirani su uzorci izuzeti nakon kiselinske predobrade pšenične slame i uzorci izuzimani tijekom uzgoja u Erlenmeyer tikvicama i u HRCB-u kako je opisano u poglavlju 3.2.6.1. Uzorci izuzeti nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize analizirani su na način kako je opisano u poglavlju 3.2.6.2..

3.2.5.1. Priprema uzoraka tekuće faze za analizu HPLC metodom

U tekući dio nakon kiselinske preobrade prije analize dodavan je kalcijev hidroksid do postizanja neutralne pH vrijednosti. Nakon toga uzorci su centrifugirani na 3000 min^{-1} kroz 15 minuta. Izuzet je supernatant volumena od $700 \mu\text{L}$ neutraliziranog uzorka tekuće faze te je dodano $700 \mu\text{L}$ 10 %-tne otopine cinkova sulfata heptahidrata čija je svrha vezati proteine i nečistoće nastale tijekom procesa za izdvajanje proteina taloženjem (poglavlje 3.2.6.3.). Uzorci su snažno izmiješani tijekom 30-tak sekundi (mikser EV-100, Tehtnica, Železniki, Slovenija) a potom su ostavljeni da odstoje 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Dobiveni talog izdvojen je centrifugiranjem na $10\,000 \text{ min}^{-1}$ kroz 5 minuta (HC-240, Tehtnica; Železniki; Slovenija), a supernatant je profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine $0,2 \mu\text{m}$ (Cromafil®Xtra PA(NY)-20 μm /25mm; Machery-Nagel CoKG, Düren, Njemačka). Za pripravu svih otopina korištena je redestilirana voda čija je vodljivost iznosila manje od $1 \mu\text{S}$. Kao pokretna faza korištena je otopina H_3PO_4 (0,1 % vol/vol) u vodi. Po $20 \mu\text{L}$ svakog uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od $55 \text{ }^\circ\text{C}$ i brzini protoka pokretne faze od $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$. Podaci su analizirani pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10.. Na isti način analizirani su uzorci izuzimani tijekom uzgoja.

Baždarni pravci za određivanje koncentracije glukoze i ksiloze dobiveni su analizom otopina standarda za navedene šećere (koncentracije 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2; 3; 5; 10 g L^{-1}) prema prethodno opisanom metodom na HPLC-u. Baždarni pravci prikazuju ovisnost površine ispod krivulje pika o koncentraciji standarda. Iz jednadžbe baždarnog pravca izračunata je koncentracija monosaharida u analiziranim uzorcima (poglavlje 7., Slika 25.).

3.2.5.2. Priprema uzoraka čvrste faze za analizu HPLC metodom

Filtrat dobiven dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom neutraliziran je dodatkom kalcijeva hidroksida do pH vrijednosti oko 5-6 jedinica (oko $0,4 \text{ g Ca(OH)}_2$ na 10 mL filtrata). Uzorak je zatim centrifugiran ($5\,000 \text{ g}$, 5 min; HC-240; Tehtnica, Železniki; Slovenija), a dobiveni supernatant je profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine $0,2 \mu\text{m}$ (33 mm ; Carl Roth, GmbH & Co, Karlsruhe, Njemačka). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustava.

3.2.5.3. Taloženje proteina iz uzoraka cinkovim sulfatom

U supernatant uzorka volumena 700 μL dodana je otopina cinkovog sulfata heptahidrata ($\gamma=100 \text{ gL}^{-1}$) u omjeru 1:1 ($V = 700 \mu\text{l}$). Dobivena otopina intenzivno je izmješana tijekom 20-ak sekundi (mikser EV-100, Tehnica, Železniki, Slovenija) i ostavljena minimalno 20 minuta pri sobnoj temperaturi da se proteini istalože. Centrifugiranjem (10 000 g, 5 min, 4 °C; Harrier 18/10 Sanyo, Watford, Velika Britanija) izdvojeni su istaloženi proteini, a dobiveni supernatant profiltriran je pomoću šprice na koje je, kao nastavak, dodan najlonski filter s porama veličine 0,20 μm (Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10AVP sustava (Poglavlje 3.1.5.3.).

3.2.6. Određivanje koncentracije glukoze i ksiloze pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC)

Kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} (Shimadzu, Kyoto, Japan) korišten je za određivanje koncentracije ugljikohidrata (glukoze, ksiloze, arabinoze), octene, levulinske, mravlje kiseline te etanola i glicerola u uzorcima. Kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina fosforne kiseline. Injektirano je 20 μL uzorka u sustav. Protok mobilne faze je bio $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$, a temperatura ionsko – izmjenjivačke analitičke kolone (SupelcogelTM C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s predkolonom (SupelcogelTM H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm) 55 °C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma (RID, eng. Refractive Index Detector). Obrada rezultata dobivenih kromatografskom analizom napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10). Pripadajuće vrijednosti očitane su iz baždarnih pravaca (Tablica 8.).

Tablica 8. Retencijska vremena i baždarni pravci.

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

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

3.2.7. Anaerobni šaržni uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama

Podloge hidrolizata pšenične slame i kontrolne hranjive podloge prethodno su pripravljene na način kako je opisano u poglavlju 3.1.3.2.. Prije anaerobnog uzgoja kontrolne podloge su sterilizirane u autoklavu na 121 °C kroz 20 minuta. Uzgoj se provodio u Erlenmeyer tikvicama od 500 mL sa ukupnim volumenom hranjive podloge od 250 mL. Anaerobni uzgoj praćen je kroz 24 sata. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* uzgojen je na podlogama koje se sastoje od hidrolizata pšenične slame dobivenih pri uvjetima predobrade. Korišteni su hidrolizati dobiveni predobradom pšenične slame sa 2,0 %-tnom fosfornom kiselinom pri temperaturama 160 °C, 180 °C i 200 °C i vremenu zadržavanja od 1, 5 i 10 minuta. Hidrolizati su prethodno neutralizirani kalcijevim hidroksidom (pH=7) te su dodane soli i kvašćev ekstrakt nakon čega su tikvice začepljenje vrenjačama koje su prethodno sterilizirane. Istovremeno je proveden uzgoj kvasca *S. cerevisiae* na kontrolnim hranjivim podlogama koje su umjesto lignoceluloznog hidrolizata sadržavale glukozu i ksilozu. Koncentracije šećera u kontrolnoj podlozi podešene su na vrijednosti približno sličnima koncentraciji šećera kao u hidrolizatima pšenične slame. U sve tikvice (tikvice koje su sadržavale hidrolizat predobrađene pšenične slame i kontrolne tikvice) nacjepljeno je 20 mL inokuluma. Sastavi hidrolizata preobrađene pšenične slame prethodno su određeni pomoću visoko učinkovite tekućinske kromatografije (HPLC) te su prikazani u tablici 4. i tablici 5. Na početku te svakog sljedećeg sata uzgoja

sterilno su uzimani uzorci volumena 5 mL. Proces anaerobnog uzgoja praćen je kako je opisano u poglavlju 3.2.9.. U tablici 2. i tablici 3. prikazan je sastav podloge za inokulum i kontrolne podloge. U podlogu za inokulum su nacjepljene kolonije kvasca prethodno porasle na kosoj podlozi, a kasnije je inokulum uzgojen u tikvici te je korišten kao inokulum za kontrolnu podlogu te hidrolizatne podloge.

3.2.8. Anaerobni šaržni uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u horizontalnom cijevnom rotirajućem bioreктору (HRCB)

Za anaerobni šaržni uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u uvećanom mjerilu korišten je horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB). HRCB ima ukupni volumen od 30 L, a sterilizira se direktnom parom. Ukupni volumen hranjive podloge bio je 5 L. Hranjiva podloga je inokulirana sa 500 mL prethodno uzgojenog inokuluma. Uzgoj je praćen kroz 26 sati te se provodio u anaerobnim uvjetima uz intervalnu rotaciju HRCB-a od 20 okretaja min⁻¹, kroz 12 minuta u svakom satu uzgoja dok je preostalih 48 minuta uzgoja HRCB mirovao. Kao podloga za uzgoj kulture kvasca korišten je hidrolizat pšenične slame dobiven predobradom pšenične slame 2,0 %-tnom fosfatnom kiselinom pri 180 °C i vremenu zadržavanja od 10 minuta (PS/ 180 °C/ 10 min/ 2 % H₃PO₄). Hranjiva podloga je prethodno pripremljena kako je opisano u poglavlju 3.1.3.3..

3.2.9. Nadzor anaerobnog uzgoja kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Za nadzor anaerobnog uzgoja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na hidrolizatima predobrađene pšenične slame izuzimani su uzorci tijekom bioprocesa u prethodno definiranim intervalima s ciljem što efikasnijeg vođenja bioprocesa. Volumen izuzimanog uzorka iz Erlenmeyer tikvica iznosio je 2,5 mL dok je volumen izuzimanog uzorka iz HRCB-a iznosio 5 mL. Tijekom anaerobnog uzgoja praćene su promjene sastojaka hranjive podloge: mikrobne biomase, supstrata i produkta te toksičnih spojeva. Promjena mikrobne biomase pratila se gravimetrijski, određivanjem broja živih stanica (log N) te određivanjem optičke gustoće hranjive podloge (OD₆₀₀). Promjene supstrata (šećera), produkta (etanola) i toksičnih spojeva (mravlja, octena, levulinska kiselina) praćeni su pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) dok je promjena koncentracije ukupnih furana praćena spektrofotometrijski.

3.2.9.1. Određivanje optičke gustoće hranjive podloge (OD_{600})

Određivanje optičke gustoće hranjive podloge provodilo se prema prethodno definiranom planu nadzora anaerobnog uzgoja kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, u Erlenmeyer tikvicama odnosno u HRCB-u. Optička gustoća hranjive podloge određivala se iz originalnog uzorka (0. razrjeđenje) i iz 1. razrjeđenja hranjive podloge. Prvo razrjeđenje hranjive podloge se pripremalo tako da je u epruvetu s 9 ml sterilne vode otpipetiran 1 ml originalnog uzorka (0. razrjeđenje) te je uzorak dobro homogeniziran. (mikser EV-100, Tehtnica, Železniki, Slovenija). Absorbancija uzorka očitana je na spektrofotometru, model „Cary 13E, Varian“ na valnoj duljini 600 nm. Kao slijepa proba korištena je čista sterilna podloga. Optička gustoća izražena je kao razlika absorbancije uzorka i slijepa probe.

3.2.9.2. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase kvasca

Za gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase kvasca korišten je originalni uzorak (0. razrjeđenje) hranjive podloge. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase kvasca provedeno je samo tijekom anaerobnog uzgoja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u HRCB-u. U prethodno osušene i izvagane kivete otpipetirano je 7 mL prethodno osušenog uzorka. Uzorak je centrifugiran kroz 15 minuta na 4500 min^{-1} . Kivete s talogom kvaščeve biomase sušene su na $75 \text{ }^\circ\text{C}$ do konstantne mase. Ohlađene kivete vagane su na analitičkoj vagi te su dobivene mase biomase kvasca koje su korištene za određivanje koncentracije biomase kvasca ($X \text{ [gL}^{-1}\text{]}$) prema jednadžbi [7]:

$$X = \frac{m_{ok} - m_{pk}}{V_{uz}} \text{ [gL}^{-1}\text{]} \quad [7]$$

m_{ok} - masa osušene kivete s biomasom; m_{pk} – masa prazne suhe kivete; V_{uz} - volumen uzorka

3.2.9.3. Određivanje ukupnog broja stanica kvasca ($\log N$)

Ukupan broj stanica kvasca određivan je naciepljivanjem uzorka (4. i 5. razrjeđenje). Na prethodno pripremljene sterilne Petrijeve ploče sa sladnim agarom naciepljivano je po 100 μL 4. i 5. razrjeđenja uzorka koji se razmaže po ploči Drigalsky štapićem. Ploče su potom inkubirane na 28 °C kroz 72 sata, a porasle kolonije su pobrojene (CFU) te je određivan ukupan broj stanica.

3.2.9.4. Priprema uzoraka za HPLC analizu

Priprema uzoraka za HPLC analizu provedena je kako je opisano u poglavlju 3.2.5.1. S obzirom da je u sastavu podloge mala koncentracija glukoze, nije bilo potrebno dodatno razrjeđenje već je nastali supernatant izravno filtriran preko mikrobioloških filtera i stavljen na analizu. Baždarni dijagrami ovisnosti površine pika o koncentraciji analiziranih spojeva nalaze se u poglavlju 7.

3.2.10. Pokazatelji uspješnosti odvijanja bioprocasa

3.2.10.1. Prinos biomase (Y_X)

$$Y_X = X - X_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [8]$$

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

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

3.2.10.2. Prinos produkta (Y_P)

$$Y_P = P - P_0 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [9]$$

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

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

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

$$Y_{X/S} = \frac{(X-X_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{Y_X}{\Delta S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [10]$$

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

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

$$Y_{P/S} = \frac{(P-P_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Y_P}{\Delta S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [11]$$

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

3.2.10.5. Produktivnost (Pr)

$$Pr = \frac{Y_X \text{ ili } Y_P}{t_U} \quad [\text{kg m}^{-3} \text{ h}^{-1}] \quad [16]$$

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

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

t_U - ukupno vrijeme bioprocesa [h]

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati kiselinske predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama (160 °C – 200 °C), vremenima zadržavanja (1 - 10 minuta) i koncentracijama fosforne kiseline ($w_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 0,5-2,0 \%$). Nakon toga provedena su preliminarna istraživanja anaerobnog uzgoja kvasca *S. cerevisiae* (divlji tip) i genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9, koji može koristiti pentoze, na hidrolizatu pšenične slame dobivenom kiselinskom predobradom u visokotlačnom reaktoru, u Erlenmeyer tikvicama. Za proizvodnju etanola u HRCB-u korišten je genetički modificirani kvasac *S. cerevisiae* Y9 na hidrolizatu pšenične slame dobivenom nakon predobrade pri 180 °C, vremenu zadržavanja od 10 min i koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 %.

Rezultati istraživanja podijeljeni su u slijedeća poglavlja:

- i. Kiselinska predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru za predobradu lignocelulozne sirovine (poglavljje 4.1.)
- ii. Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* (divlji tip) i genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 na hidrolizatu pšenične slame u Erlenmeyer tikvicama (poglavljje 4.2.)
- iii. Anaerobni uzgoj genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 na hidrolizatu pšenične slame u HRCB-u (poglavljje 4.3.)

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

U ovom poglavlju prikazani su rezultati dobiveni kiselinskom predobrađom pšenične slame u visokotlačnom reaktoru za predobrađu lignoceluloznih sirovina. Rezultati dobiveni predobrađom pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama, vremenima zadržavanja i koncentracijama fosforne kiseline prikazani su na slikama 9. - 12. te u tablicama 10. – 13..

U ovom radu najprije je provedena analiza sastava korištene lignocelulozne sirovine – pšenične slame. Sastav pšenične slame kao sirovine za predobrađu pomoću fosforne kiseline u visokotlačnom reaktoru prikazan je u tablici 9. Metode koje su se koristile za određivanje sastava prikazane su u poglavljima 3.2.4.3., 3.2.4.5., i 3.2.5.1..

Tablica 9. Sastav pšenične slame određen nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize.

Wglukan (%)	Wksilan (%)	Warabinan (%)	WLNTK (%)	WHAc (%)	Wmravlja kiselina (%)	Wlevulinska kiselina (%)	Wfurani (%)	WLTK (%)
51,39	21,06	5,12	15,88	3,04	2,21	0,00	n.o.	0,24

n.o., nije određeno

Pšenična slama je najrasprostranjeniji usjev na zemlji kultiviran u više od 115 zemalja (Talebna u sur., 2012). U posljednjih sto godina prinosi pšenične slame su povećani te je 2008. godine procjenjeno da je godišnja globalna proizvodnja pšenične slame iznosi preko 650 GT (Atwell i sur., 2001). Analiza sastava ugljikohidratnih polimera pšenične slame provedena je nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize pšenične slame tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Prema dobivenim rezultatima pšenična slama je sadržavala: 48,39 % glukana, 25,18 % ksilana i 4,3 % arabinana što ukupno čini 77,87 % ugljikohidrata u sirovini. Ukoliko se dobiveni udjeli ugljikohidratnih polimera pšenične slame usporede sa literaturnim podacima mogu se opaziti određena odstupanja. Kao referentna vrijednost uzete su literaturne vrijednosti prema Boe i sur. (2007), te je vidljivo da dobiveni rezultati sastava pšenične slame odstupaju od literaturnih podataka. Navedena odstupanja moguće su posljedice različitosti vrste slame, klimatskog pojasa u kojem je ona uzgojena, ali i korištenih analitičkih metoda. Udio

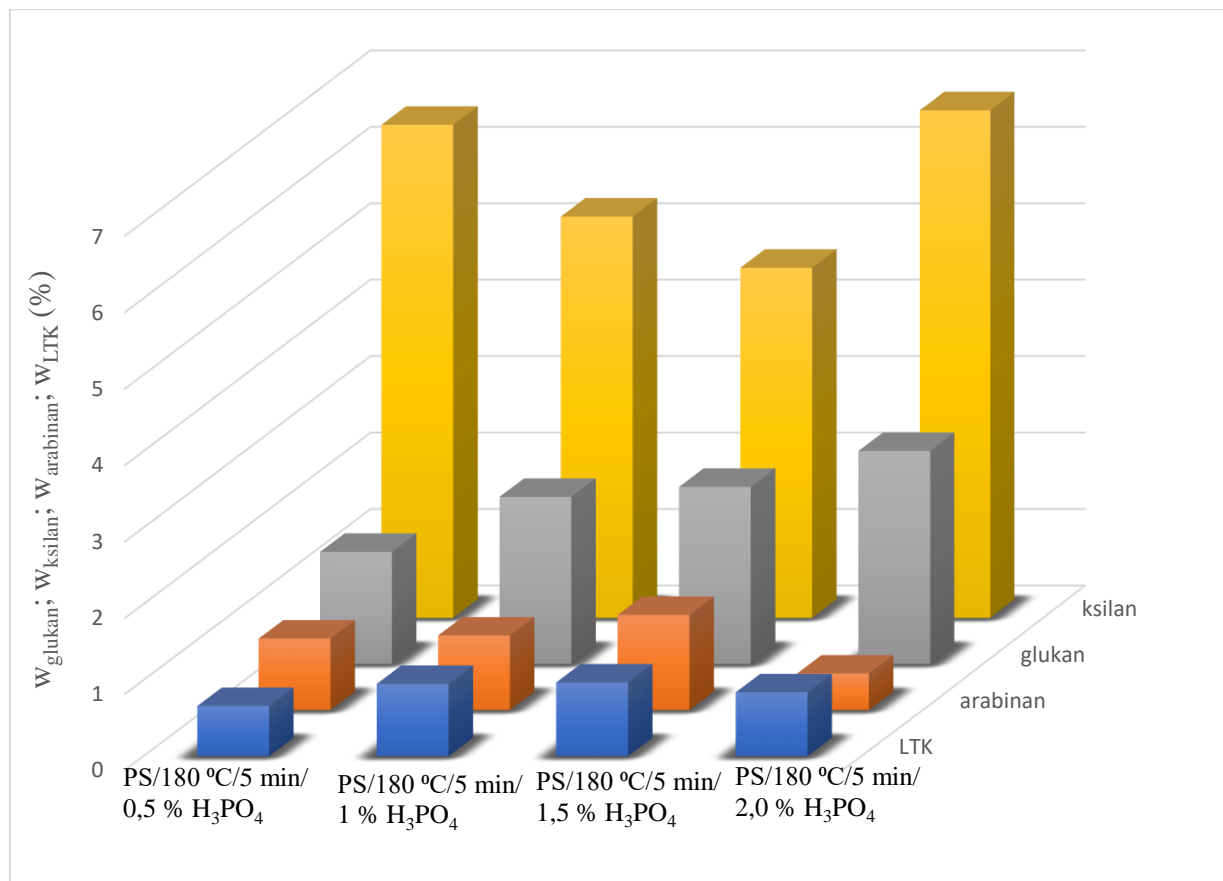
lignina netopivog u kiselini (LNTK) iznosi 15,88 % što se ne razlikuje puno od maksimalnog udjela prema literaturnim podacima (16,5 %, Boe i sur., 2010). Udio lignina topivog u kiselini (LTK) je zanemarivo mali te iznosi 0,24 %. Od ostalih spojeva određeno je 3,04 % octene kiseline, 2,21 % mravlje kiseline te 0,76 % levulinske kiseline. Udio celuloze, hemiceluloze i lignina u pšeničnoj slami je u rasponu od 33-40, 20-25 i 15-20 % (Prased i sur., 2007). Da bi se pšenična slama mogla primjeniti kao sirovina za proizvodnju bioetanolu uz pomoć kvasca *S. cerevisiae* najprije je morala proći proces mehaničke predobrade koji je uključivao usitnjavanje pšenične slame mlinom čekićarem kako je opisano u poglavlju 3.2.2.. Tako usitnjena pšenična slama podvrgnuta je daljnjem kemijskom procesu predobrade odnosno kiselinskoj hidrolizi razrijeđenom fosforom kiselinom. Provedeno je 12 pokusa predobrade pšenične slame uz promjenu temperature (160 °C, 180 °C, 200 °C), vremena zadržavanja (1, 5, 10 min) i koncentracije fosforne kiseline ($w_{H_3PO_4}$ = 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 %). Nakon završenog procesa predobrade dobivene su dvije faze hidrolizata – tekuća i čvrsta faza hidrolizata.

Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru provedena je kako je opisano u poglavlju 3.2.3., (Tablica 7.). Za kiselinsku predobradu pšenične slame u visokotlačnom reaktoru korištena je fosforna kiselina. Cilj ovog rada bio je odrediti uvjete procesa pri kojima se ostvaruje najveći prinos fermentabilnih šećera, uz fosforu kiselinu kao katalizator. Drugi cilj ovog dijela eksperimenta bio je odrediti uvjete procesa predobrade pri kojima se ostvaruje najmanji prinos nusprodukata koji usporavaju ili inhibiraju proces proizvodnje bioetanolu. Četiri pokusa predobrade provedena su pri 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 minuta i različitim koncentracijama fosforne kiseline ($w_{H_3PO_4}$ = 0,5 – 2,0 %; poglavlje 4.1.1.). Nakon određivanja optimalne koncentracije fosforne kiseline, ispitan je i utjecaj različitih temperatura i vremena zadržavanja na uspješnost hidrolize pšenične slame (poglavlje 4.1.2.).

4.1.1. Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri različitim koncentracijama fosforne kiseline

U ovom poglavlju prikazani su rezultati kiselinske predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri temperaturi od 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 minuta i različitim koncentracijama fosforne kiseline ($w_{H_3PO_4}$ = 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 %). Udjeli pojedinih

komponentata prikazani su kao postotak od 500 g suhe tvari neobrađene slame (slike 9. i 10. i tablica 10.).



Slika 9. Udjeli glukana, ksilana, arabinana i lignina topivog u kiselini (LTK) u tekućem dijelu hidrolizata pšenične slame dobivenom nakon kiselinske predobrade u visokotlačnom reaktoru pri 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 minuta i različitim koncentracijama fosforne kiseline ($W_{H_3PO_4} = 0,5 - 2,0 \%$).

Tablica 10. Mase šećera (glukoza, ksiloza, arabinoza) i iskorištenje ukupnih ugljikohidrata, glukoze, ksiloze i arabinoze nakon kiselinske predobrade u visokotlačnom reaktoru pri 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 minuta i različitim koncentracijama fosforne kiseline ($w_{H_3PO_4} = 0,5 - 2,0 \%$) u tekućem dijelu hidrolizata pšenične slame.

Temperatura [°C]	vrijeme zadržavanja [min]	$w_{H_3PO_4}$ [%]	$m_{ukupni\ UH}$ [g]	$m_{glukoza}$ [g]	$m_{ksiloza}$ [g]	$m_{arabinoza}$ [g]	Iskorištenje hidrolize UH [%]	Iskorištenje hidrolize glukoze [%]	Iskorištenje hidrolize ksiloze [%]	Iskorištenje hidrolize arabinoze [%]
180	5	0,5	37,49	5,96	27,64	3,89	8,60	2,21	64,18	16,29
		1	47,03	12,19	29,33	5,50	10,79	4,53	68,12	23,03
		1,5	44,69	12,76	24,84	7,09	10,26	4,75	57,68	29,71
		2	54,56	15,52	36,31	2,74	12,52	5,77	84,29	11,45

*UH – ukupni ugljikohidrati

Cilj ovog dijela eksperimenta bio je odrediti uvjete predobrade pri kojima se ostvaruje najveći prinos fermentabilnih šećera i najmanji prinos nusprodukata koji usporavaju ili inhibiraju proces proizvodnje bioetanol. U prethodnim istraživanjima (Govedarica, Lauder, Ivančić, 2016) u sklopu HRZZ projekta „Proizvodnja bioetanol i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina na principima ekološke i ekonomske održivosti“ (SPECH-LRM; šifra projekta 9158) svi eskperimenti predobrade provedeni su pri temperaturi od 210 °C. Cilj ovog dijela eksperimenta također je bio ispitati mogućnost povećanja ekonomičnosti procesa proizvodnje bioetanol smanjenjem temperature pri kojima se provodi predobrada kako bi se u konačnici smanjili troškovi procesa predobrade i posljedično tome povećala ekonomičnost cijelog procesa proizvodnje. Zbog navedenog razloga procesi predobrade u ovom dijelu rada provedeni su pri nižoj temperaturi nego u prijašnjim istraživanjima odnosno pri temperaturi od 180 °C. Za provođenje svih eksperimenata predobrade odabrana je fosforna kiselina. Uporaba fosforne kiseline kao katalizatora za kiselinsku hidrolizu lignoceluloznih sirovina pokazuje brojne prednosti pred ostalim kiselinama. Za razliku od ostalih kiselina fosforna kiselina je manje toksična (Satimanont i sur., 2012). Nadalje, uporabom fosforne kiseline kao katalizatora izbjegava se potreba za daljnjim pročišćavanjem hidrolizata, ukoliko se on koristi kao hranjiva podloga za uzgoj mikroorganizama. Nakon neutralizacije hidrolizata lignocelulozne sirovine nastaju soli kao npr. natrijev fosfat. Takve soli nije potrebno uklanjati iz hidrolizata s obzirom da one predstavljaju izvor nutritijenata za mikroorganizme (Lenihan i sur., 2009). Nakon kiselinske predobrade pšenične slame pri temperaturi od 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 minuta i različitim koncentracijama fosforne kiseline vidljivo je da mase šećernih polimera variraju (Slika 9.). Najveća masa glukana dobivena je nakon kiselinske predobrade pšenične slame pri koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 %, dok je najmanja masa glukana dobivena nakon kiselinske predobrade pšenične slame pri koncentraciji fosforne kiseline od 0,5 %. Dobiveni udjeli ksilana veći su nego udjeli glukana u tekućem dijelu hidrolizata i kreću se u rasponu od 4,58 do 6,65 %. Najveći udio ksilana u iznosu od 6,65 % postignut je pri koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 %, dok je najmanji udio ksilana u iznosu od 4,58 % postignut pri koncentraciji fosforne kiseline od 1,5 %. Veći udjeli ksilana u odnosu na udjele glukana u tekućem dijelu hidrolizata mogu se objasniti strukturom hemiceluloze. Hemiceluloza je heteropolimer ugljikohidrata koji se sastoji od 5 - C šećera (ksiloza, arabinoza) i 6 - C šećera (manoza, glukoza, galaktoza). Struktura hemiceluloze je amorfna i razgranata što je razlog lakše razgradnje hemiceluloze u odnosu na celulozu (Satimanont i sur., 2012). To potvrđuju i rezultati iskorištenja glukoze, odnosno ksiloze (Tablica 10.). Iskorištenja ksiloze su puno veća u odnosu

na iskorištenja glukoze, te se kreću u rasponu od 57,68 % do 84,29 %. Najveće iskorištenje ksiloze u uvjetima predobrade pri 180 °C i vremenu zadržavanja od 5 minuta postignuto je kod koncentracije fosforne kiseline od 2,0 % (84,29 %). Iskorištenja glukoze kreću se u rasponu od 2,21 % do 5,77 % te je najveće iskorištenje glukoze (5,77 %) također postignuto pri koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 %. Usporedbom rezultata s Leihan i sur. (2009), očito je kako korištena koncentracija fosforne kiseline ima veliki utjecaj na sastav tekućeg dijela hidrolizata pšenične slame nakon predobrade. Povišenjem koncentracije kiseline povećava se brzina nastajanja šećera. Isto tako zabilježeno je da povećanje koncentracije fosforne kiseline (do 10,0 %) može uzrokovati raspad monomernih šećera do furana koji se dalje mogu prevesti do octene, mravlje i levulinske kiseline (Lenihan i sur., 2009). U istraživanju provedenom od strane Lenihan i sur. (2009) pri temperaturi od 135 °C i koncentracijama fosforne kiseline od 5 % i 7,5 % razgrađuje se do 25 % odnosno 56 % šećera, dok se pri istoj temperaturi i koncentraciji fosforne kiseline od 10,0 % razgrađuje čak 69 % šećera. Jedna od prednosti uporabe kiselina manjih koncentracije (do 2,5 %), osim manjih troškova, je i neznatan utjecaj na brzinu razgradnje šećera do inhibirajućih produkata. Iz navedenog razloga u ovom radu nisu korištene koncentracije fosforne kiseline veće od 2,0 %. Povećanje koncentracije kiseline tijekom kiselinske predobrade lignoceluloznih sirovina ima veći utjecaj na prinos šećera u usporedbi povećanjem temperatura, međutim u odnosu na povećanje koncentracije kiseline povećanje temperature ima puno veći utjecaj na brzinu razgradnje šećera do neželjenih nusprodukata i posljedično tome smanjenje prinosa šećera (Lenihan i sur., 2009). Upravo zato su svi daljnji eksperimenti u ovom radu provedeni na način da se varirala temperatura (160 °C, 180 °C, 200 °C) i vrijeme zadržavanja (1, 5, 10 min) uz koncentraciju fosforne kiseline od 2,0 %. Vrijednosti za udjele arabinana u tekućem dijelu hidrolizata su približno jednake i kreću se u rasponu od 0,48 % do 1,25 %. Najveći udio arabinana (1,25 %) postiže se pri koncentraciji fosforne kiseline od 1,5 %. Povećanjem koncentracije fosforne kiseline udio arabinana u tekućem hidrolizatu se smanjuje. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da povećanjem koncentracije fosforne kiseline dolazi do razgradnje arabinana. Arabinoza se pri povišenim temperaturama i koncentracijama kiseline razgrađuje puno brže nego ksiloza stoga su konačni udjeli arabinana nakon provedene kiselinske hidrolize puno manji u odnosu na udjele glukana i ksilana (Hu i sur., 2008). Prema dobivenim rezultatima udjeli lignina topivog u kiselini (LTK) približno su jednaki te se kreću u rasponu od 0,66 % do 0,97 %.

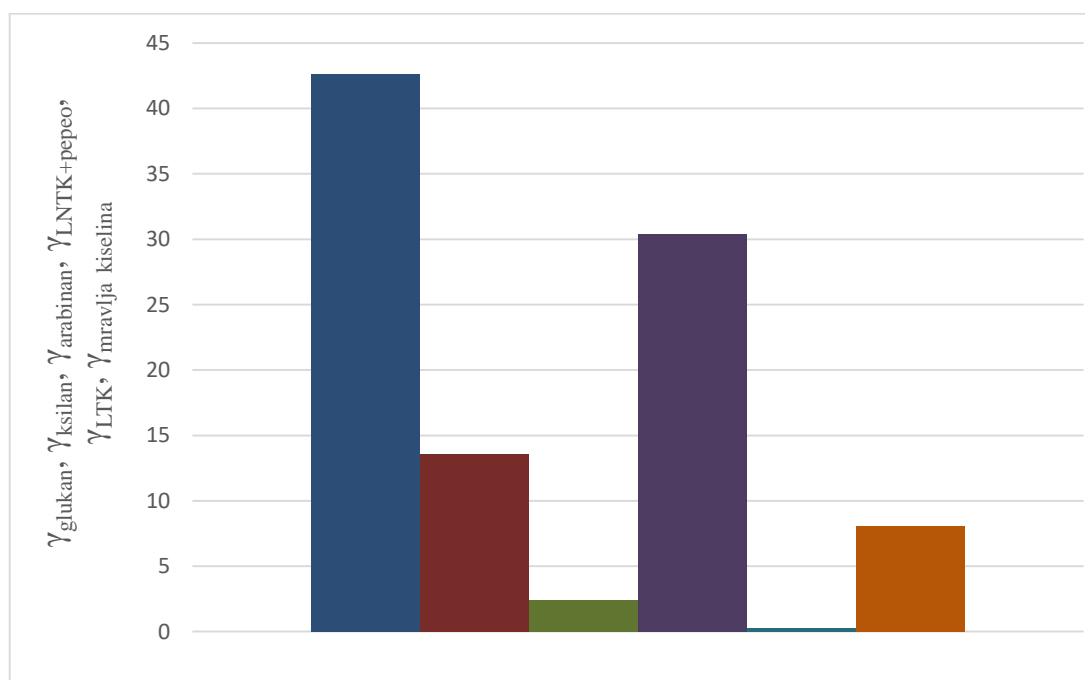
S obzirom da je predobradom pšenične slame pri temperaturi od 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 min i koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 % dobiven najveći udio

fermentabilnih ugljikohidrata, izraženih kao glukan i ksilan, u odnosu na ostale uvjete predobrade, provedena je daljnja predobrada pšenične slame pri koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 % uz varijacije temperature (160 °C, 180 °C, 200 °C) i vremena zadržavanja (1, 5, 10 min) (poglavlje 4.1.2.).

Tijekom provođenja kiselinske hidrolize lignoceluloznih sirovina neizbježno je oslobađanje inhibirajućih komponenata kao što su 5-hidroksimetilfurfural (HMF) koji nastaje dehidracijom heksoza i 2-furfuralaldehid (furfural) koji nastaje dehidracijom pentozna. HMF i furfural, zajedno sa octenom, mravljom i levulinskom kiselinom, koje nastaju tijekom brojnih sekundarnih reakcija usporavaju fermentacijske procese na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina te je često, za daljnje odvijanje procesa, potrebno njihovo uklanjanje (Lenihan i sur., 2009). Stoga su osim koncentracija ugljikohidrata u tekućem dijelu hidrolizata, tijekom eksperimenata, određene i koncentracije octene, mravlje i levulinske kiseline te furana. Najveći udio ukupnih furana dobiven je pri koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 % u iznosu od 0,23 %. Pri temperaturi od 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 minuta i koncentraciji fosforne kiseline od 0,5 %, 1 %, 1,5 % i 2,0 % dobiveni su približno jednaki udjeli octene kiseline (raspon od 0,45-0,83 %). Tijekom procesa kiselinske predobrade iz HMF-a i furfurala nastaje i mravlja kiselina (Jönsson i sur., 2013). Pri temperaturi od 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 minuta i različitim koncentracijama fosforne kiseline dobiveno je u rasponu od 0,50 – 0,91 % mravlje kiseline. Levulinska kiselina nastaje razgradnjom HMF-a pri visokoj temperaturi i uz prisutnost kiseline (Jönsson i sur., 2013). Pri temperaturi od 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 minuta i različitim koncentracijama fosforne kiseline levulinska kiselina nije detektirana. Povećanjem koncentracije fosforne kiseline raste udio furana (HMF-a i furfurala) međutim promjene koncentracije fosforne kiseline nemaju značajniji utjecaj na ostale inhibitore (octena kiselina, mravlja kiselina, levulinska kiselina) koji nastaju kao produkti razgradnje furana te također djeluju inhibirajuće na aktivnost kvasca. Unatoč povećanju koncentracije fosforne kiseline koncentracija ostalih inhibitora (octene, mravlje, levulinske kiseline) je približno konstantna (< 0,9 %). Dobivene koncentracije octene kiseline su u rasponu od 0,09 do 0,14 gL⁻¹, dok su koncentracije mravlje kiseline u rasponu od 0,10 gL⁻¹ do 0,15 gL⁻¹ te u navedenim koncentracijama octena odnosno mravlja kiselina ne djeluju inhibirajuće na rast kvasca *S. cerevisiae*.

Sastav čvrste faze dobivene nakon predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru određen je nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize uz visokoučinkovitu tekućinsku kromatografiju (HPLC) kako je opisano u poglavlju 3.2.5.2.. Sastav čvrste faze određen je samo

za eksperiment predobrade pri temperaturi od 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 min i koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 % jer je pri ovim uvjetima u tekućoj fazi (hidrolizatu pšenične slame) određen najveći udio strukturnih ugljikohidrata (glukana, ksilana, arabinana). Maseni udjeli komponenata čvrste faze (glukana, ksilana, arabinana i lignin netopivog u kiselini (LNTK), lignina topivog u kiselini (LTK) i mravlje kiseline) dobiveni nakon kiselinske predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 minuta i koncentraciji fosfatne kiseline od $w_{H_3PO_4} = 2,0$ % prikazani su na slici 10.



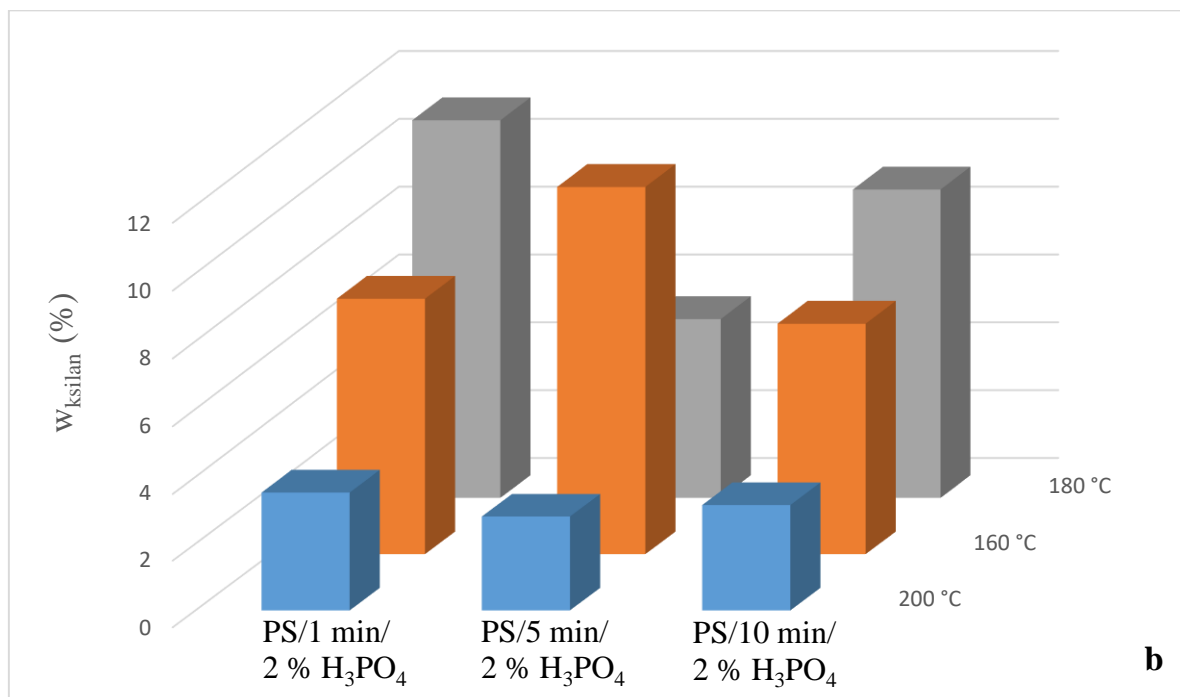
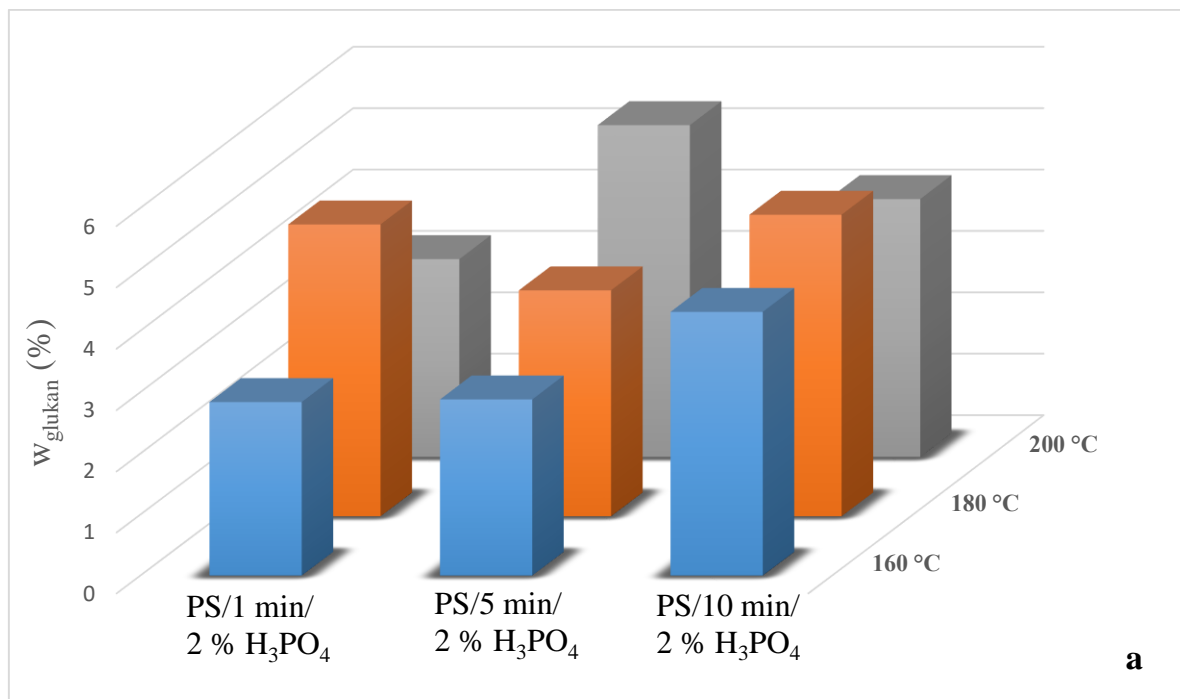
Slika 10. Maseni udjeli komponenata čvrste faze hidrolizata ((■) glukan, (■) ksilan, (■) arabinan, (■) lignin netopiv u kiselini (LNTK) + pepeo), (■) lignin topiv u kiselini (LTK) i (■) mravlja kiselina) dobiveni nakon predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 minuta i koncentraciji fosforne kiseline ($w_{H_3PO_4} = 2,0$ %).

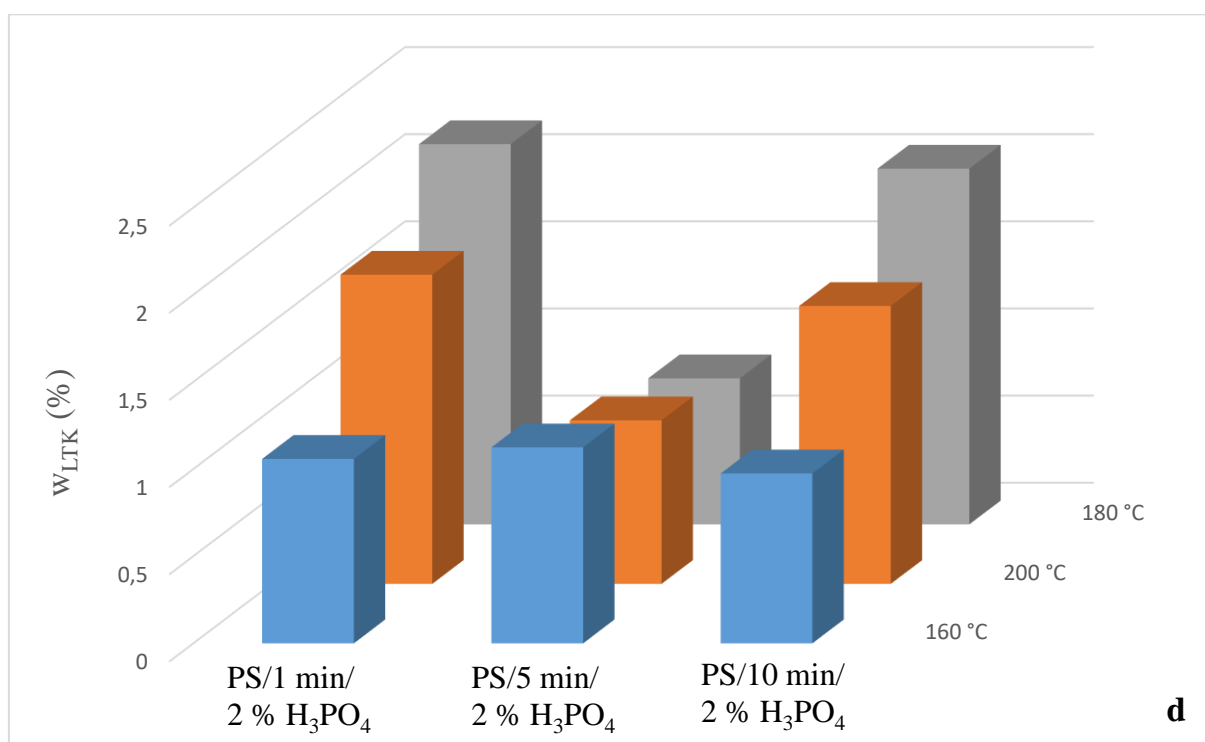
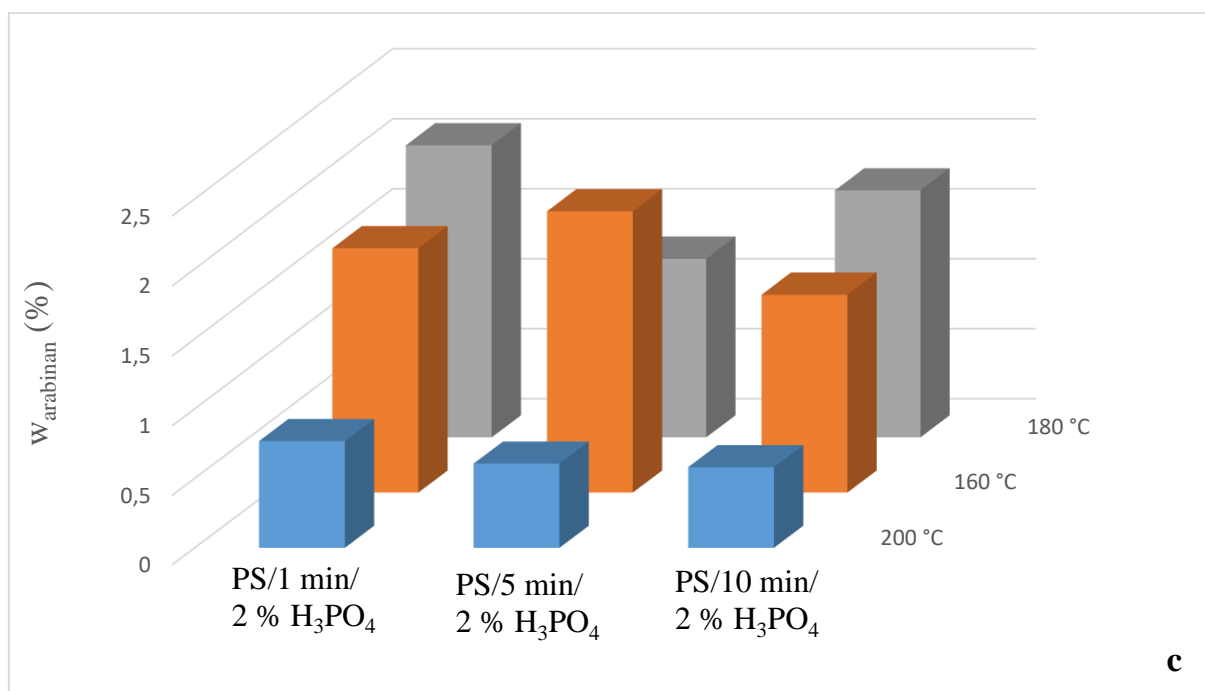
U sastavu čvrste faze hidrolizata predobrađene pšenične slame udio glukana iznosi 42,63 %, dok je udio ksilana 13,60 %. Veći udio glukana u odnosu na udio ksilana ukazuje na bolju hidrolizu celuloze u odnosu na hemicelulozu tijekom provedenog procesa predobrade pri temperaturi od 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 min i koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 %. Veći stupanj polimerizacije hemiceluloze i veća razgranatost strukture u odnosu na celulozu doprinosi većoj topivosti i lakšoj razgradnji hemiceluloze u odnosu na celulozu (Chandler i sur., 2012). Udio arabinana je u iznosu od 2,37 %. Lignin netopiv u kiselini (LNTK) i pepeo u čvrstoj

fazi iznose 30, 40 %, dok je udio lignina topivog u kiselini (LTK) zanemariv (0,25 %). Nusproizvodi, osim mravlje kiseline, nakon predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru, u potpunosti su izostali iz čvrste faze. Detektirana je jedino mravlja kiselina u iznosu od 8,06 % vjerojatno jer čvrsta faza, nakon predobrade i provođenja dvostupanjske kiselinske hidrolize, nije isprana dovoljnom količinom vruće vode.

4.1.2. Predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama i vremenima zadržavanja uz koncentraciju fosforne kiseline od 2,0 %

U ovom poglavlju prikazani su rezultati kiselinske predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri temperaturama od 160 °C, 180 °C i 200 °C, vremenima zadržavanja od 1 min, 5 min i 10 min i koncentraciji fosforne kiseline od $w_{H_3PO_4} = 2,0 \%$ (Tablica 11. - 13. i Slika 11. (a - d). Nakon provedene predobrade, dobivene su dvije faze, tekuća i čvrsta faza, koje su zasebno analizirane metodama opisanim u poglavljima 3.2.4.3., 3.2.4.4., 3.2.4.5., 3.2.5.1. i 3.2.5.2.. Udjel strukturnih ugljikohidrata (glukan, ksilan, arabinan) i lignina topivog u kiselini (LTK) u tekućem dijelu hidrolizata pšenične slame prikazan je na slici 11.. Osim koncentracije ugljikohidrata određena je i koncentracija nusproizvoda predobrade kao što su octena kiselina, levulinska kiselina, mravlja kiselina i furani (furfural i HMF). Udjeli octene kiseline, mravlje kiseline, levulinske kiseline i furana u tekućem dijelu hidrolizata pšenične slame prikazani su u tablici 11..





Slika 11. Udjeli glukana (a), ksilana (b), arabinana (c) i lignina topivog u kiselini (d) u tekućem dijelu hidrolizata pšenične slame dobivenom nakon kiselinske predobrade u visokotlačnom reaktoru pri 160 do 200 °C, vremenu zadržavanja od 1 do 10 minuta i koncentraciji fosforne kiseline od $w_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 2,0 \%$.

Tijekom predobrade pri temperaturi od 160 °C i vremenu zadržavanja od 1 min dobivena je najmanja količina glukana koja iznosi 2,84 %, a najmanja količina ksilana dobivena pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min te iznosi 2,82 %. Nakon predobrade pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min odnosno temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 1 min dobiva se najveći udio fermentabilnih ugljikohidrata, izraženih kao glukan i ksilan, koji iznose 5,40 % za glukan i 11,14 % za ksilan. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da u tekućem dijelu hidrolizata, dobivenom nakon predobrade pšenične slame, najveći udio ima ksiloza, odnosno ksilan (Slika 11.). Razlog tomu je struktura hemiceluloze koja je amorfnja i razgranata što čini hemicelulozu lako razgradivom, za razliku od celuloze i lignina (Ivančić Šantek i sur., 2016). Navedena promjena ima za posljedicu povećanje udjela ksiloze koja je građevna jedinica hemiceluloze, u odnosu na glukozu u tekućem dijelu hidrolizata pšenične slame (Satimanont i sur., 2012). Povećanje udjela strukturnih ugljikohidrata pridonosi i povećanje temperature tijekom kiselinske predobrade (Satimanont i sur., 2012). Tako povišenjem temperature (sa 160 °C na 180 °C) uz isto vrijeme zadržavanja (1 min) udio ksilana raste te pri temperaturi predobrade od 160 °C udio ksilana iznosi 7,56 % dok je pri temperaturi predobrade od 180 °C udio ksilana veći i iznosi 11,14 %. Povećanje udjela strukturnih ugljikohidrata također je vidljivo povećanjem vremena zadržavanja tijekom provođenja kiselinske predobrade. Tako je pri istoj temperaturi predobrade (200 °C) i različitim vremenima zadržavanja (1 min i 5 min) udio glukana različit odnosno povećava se produljenjem vremena zadržavanja. Pri temperaturi predobrade od 200 °C i vremenu zadržavanja od 1 min udio glukana je 3,22 %, a pri temperaturi predobrade od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min taj udio glukana raste na 5,40 %. Može se primjetiti da je pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 10 min zabilježen suprotan trend, odnosno povećanjem temperature predobrade s 180 °C na 200 °C udio ksilana se smanjuje na 3,16 %. Pad udjela ksilana pri višim temperaturama (200 °C) posljedica je razgradnje ksiloze pri višim temperaturama do furfurala (Satimanont, 2012). Hu i sur. (2008) su iz eksperimentalnih podataka zaključili da tijekom provođenja kiselinske predobrade kiselina ima ulogu katalizatora cijepanja β -1,4-glikozidne veze u ksilooligomerima što dovodi do povećanja prinosa ksiloze. Međutim, provođenje kiselinske predobrade pri većim temperaturama i koncentracija kiselina rezultirat će depolimerizacijom ksilana (hemiceluloze) i dovesti do oslobađanja inhibitora. Vrijednosti za arabinan su podjednake te se nalaze u rasponu od 0,58 % do 2,08 % (Slika 11). Maksimalan udio arabinana od 2,08 % zabilježen je predobradom pšenične slame pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 1 min, a minimalan udio arabinana od 0,58 % postignut je predobradom pšenične slame pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja

od 10 min. Povećanje temperature i vremena zadržavanja tijekom kiselinske predobrade doprinosi većem udjelu arabinana (Lenihan i sur., 2009). Tako udio arabinana pri temperaturi od 160 °C i vremenu zadržavanja od 1 min iznosi 1,75 %, a pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 1 min 2,08 %. Nakon postizanja maksimalnog udjela arabinana pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 1 min (2,08 %) daljnjim povećanjem temperature na 200 °C kod vremena zadržavanja od 1 min udio arabinana se smanjuje na 0,77 %. Razlog tomu je što se arabinoza pri povišenim temperaturama i vremenima zadržavanja brže razgrađuje u odnosu na ksilozu (Gunnarsson i sur., 2008). Udjeli lignina topivog u kiselini (LTK) nakon provedenih postupaka predobrade pri temperaturama od 160 °C do 200 °C i vremenima zadržavanja od 1 do 10 minuta nalaze u rasponu od 0,84 do 2,18 % (Slika 11.).

Tablica 11. Udjeli octene kiseline, mravlje kiseline, levulinske kiseline i furana u tekućem dijelu hidrolizata pšenične slame dobivenom nakon kiselinske predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri 160 do 200 °C, vremenu zadržavanja od 1 do 10 minuta i koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 %.

Temperatura [°C]	vrijeme zadržavanja [min]	Woctena kiselina [%]	Wmravlja kiselina [%]	Wlevulinska kiselina [%]	Wfurani [%]
160	1	1,05	0,92	0,00	0,082
	5	0,98	1,04	0,00	0,186
	10	1,05	0,93	0,00	0,066
180	1	1,31	1,42	0,00	0,52
	5	1,35	1,14	0,00	0,81
	10	1,31	1,33	0,00	0,50
200	1	0,78	0,83	0,07	0,07
	5	1,21	0,89	0,17	0,17
	10	0,99	1,13	0,15	0,15

Tijekom kiselinske hidrolize lignoceluloznih sirovina pentoze, nastale hidrolizom hemiceluloze, pri visokim temperaturama i vremenima zadržavanja, razgrađuju se do 2-furaladehida (furfurala), odnosno heksoze, nastale razgradnjom celuloze i hemiceluloze, pri višim temperaturama i vremenima zadržavanja prevode se do 2-hidroksimetilfurfurala (HMF) (Ko i sur., 2015). Daljnjim povećanjem parametara kiselinske predobrade (temperature i vremena zadržavanja), HMF se razgrađuje do levulinske i mravlje kiseline dok se furfural pri većim temperaturama i dužem vremenu zadržavanja prevodi do mravlje kiseline (Palmqvist i

sur., 2000). Udio ukupnih furana (furfural i HMF) zabilježen tijekom ove kiselinske predobrade bio je u rasponu od 0,08 % do 0,19 %. Predobradom pšenične slame pri temperaturi od 160 °C i vremenu zadržavanja od 10 min zabilježen je najmanji udio ukupnih furana u iznosu od 0,06 %, dok je pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 1 min zabilježen najveći udio ukupnih furana u iznosu od 1,49 % (Tablica 11.). Hidrolizati lignoceluloznih sirovina također sadrže i alifatske kiseline, kao što su octena, mravlja i levulinska kiselina. Octena kiselina primarno nastaje hidrolizom acetilnih grupa hemiceluloze (Jönsson i sur., 2013). Levulinska kiselina nastaje razgradnjom HMF pri visokoj temperaturi i u prisutnosti kiseline (Jönsson i sur., 2013). Osim levulinske kiseline, tijekom procesa kiselinske predobrade iz HMF i furfurala nastaje i mravlja kiselina (Jönsson i sur., 2013, Ulbricht i sur., 1984). Udio alifatskih kiselina u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina ponajviše ovisi o vrsti sirovine i uvjetima predobrade. Sirovine sa većim udjelom acetiliranog ksilana, kao što su poljoprivredni ostaci, u koje se svrstava i pšeniča slama, i tvrdo drvo daju veće koncentracije alifatskih kiselina od mekog drveta. Najveći udio octene kiseline (1,42 %) nastaje predobradom pšenične slame pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 1 min. Daljnjim povećanjem temperature, vremena zadržavanja i koncentracije kiseline, HMF se razgrađuje do levulinske i mravlje kiseline. Pri temperaturama od 160 °C i 180 °C, kod svih vremena zadržavanja (1 min, 5 min i 10 min) levulinska kiselina nije detektirana. Pri temperaturi od 200 °C kod svih vremena zadržavanja (1 min, 5 min i 10 min) zabilježena je prisutnost levulinske kiseline u rasponu od 0,07 – 0,15 %. Udio mravlje kiseline, koja je nastala pri svim uvjetima predobrade, približno je jednaka i kreće se u rasponu od 0,77 do 1,34 %. Najveći udio mravlje kiseline od 1,34 % postiže se predobradom pšenične slame pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 5 min (Tablica 11.).

Tablica 12. Masa ukupnih ugljikohidrata, glukoze, ksiloze i arabinoze i iskorištenje ukupnih ugljikohidrata, glukoze, ksiloze i arabinoze u tekućem dijelu hidrolizata pšenične slame dobivenom nakon kiselinske predobrade u visokotlačnom reaktoru pri temperaturama od 160 do 200 °C, vremenu zadržavanja od 1 do 10 minuta i koncentracijama fosforne kiseline od 2,0 %.

Temperatura (°C)	Vrijeme zadržavanja (min)	m _{ukupni UH} [g]	m _{glukoza} [g]	m _{ksiloza} [g]	m _{arabinoza} [g]	Iskorištenje hidrolize ukupnih ugljikohidrata [%]	Iskorištenje hidrolize glukoze [%]	Iskorištenje hidrolize ksiloze [%]	Iskorištenje hidrolize arabinoze [%]
160	1	68,53	15,82	42,98	9,73	15,13	5,89	30,04	40,73
	5	88,88	15,98	61,67	11,22	20,40	7,56	43,11	46,97
	10	70,69	23,99	38,79	7,91	16,22	8,92	27,11	33,11
180	1	101,31	26,44	63,29	11,58	23,83	9,84	44,24	48,47
	5	54,97	19,57	28,62	6,77	12,61	7,27	20,00	28,34
	10	88,76	27,33	51,68	9,82	20,37	10,16	36,12	41,11
200	1	42,19	11,92	2,07	0,06	9,68	4,43	1,45	6,07
	5	49,39	30,03	16,01	3,37	11,23	11,17	11,19	15,49
	10	44,76	23,56	17,97	3,23	10,18	8,74	12,56	13,52

*Ukupni UH-ukupni ugljikohidrati

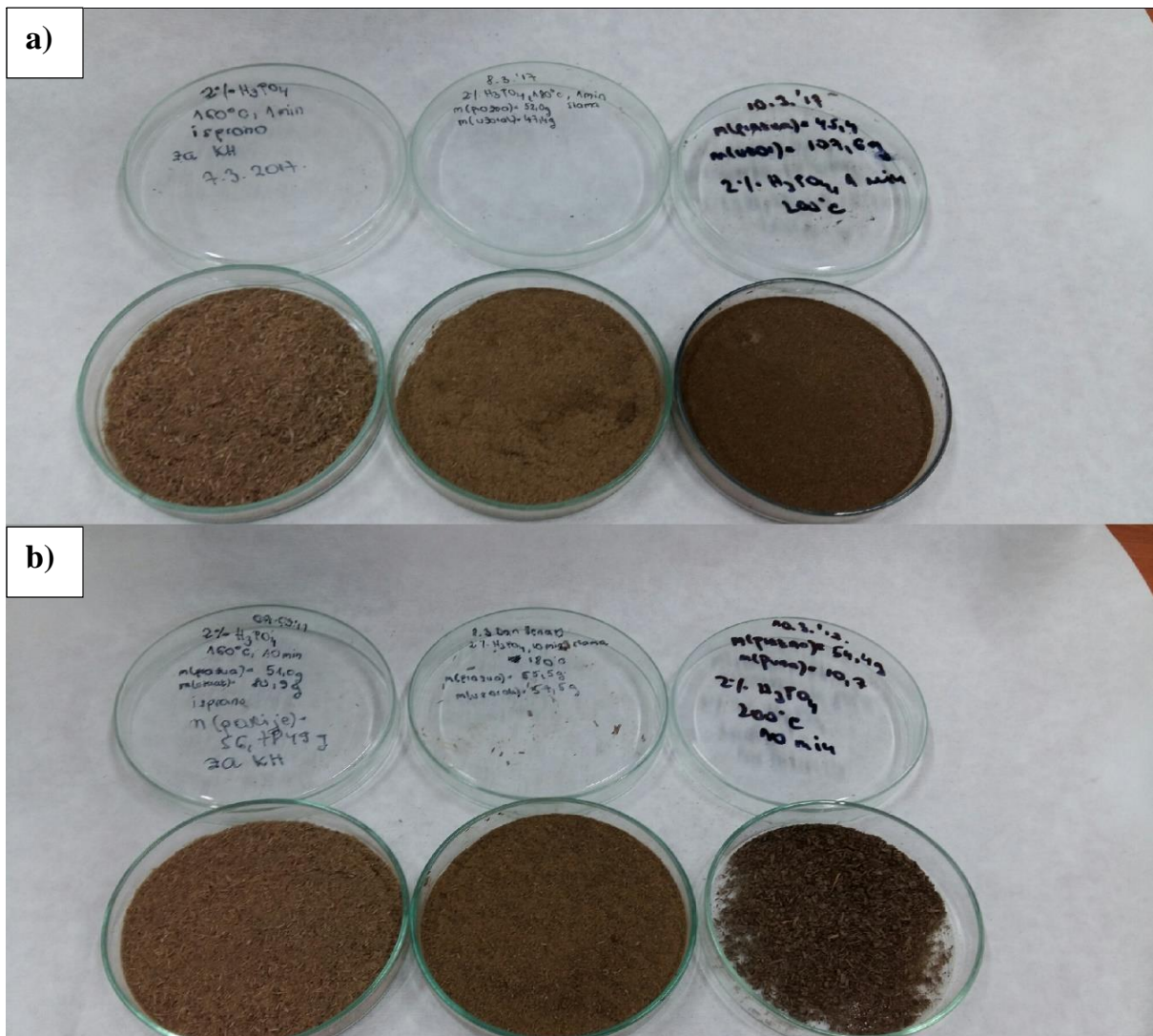
Tablica 13. Sastav čvrste faze nakon kiseline predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri temperaturama od 160 do 200 °C, vremenu zadržavanja od 1 do 10 minuta i koncentracijama fosforne kiseline od 2,0 %.

Temperatura (°C)	vrijeme zadržavanja (min)	mčvrsta faza [g]	Wglukan [%]	Wksilan [%]	Warabinan [%]	WLNTK [%]	WLTK [%]	Wmravlja kiselina [%]
160	1	241,81	50,86	8,61	0,29	30,25	0,24	7,58
	5	214,96	47,51	12,03	1,64	30,54	0,25	8,02
	10	137,64	53,90	6,71	0,00	30,99	0,25	8,14
180	1	191,45	82,43	19,64	9,01	38,49	0,31	10,11
	5	350,94	32,40	19,34	4,38	35,27	0,26	8,36
	10	179,63	42,63	13,60	2,37	32,57	0,26	8,56
200	1	339,72	26,45	18,84	5,17	38,31	0,26	8,60
	5	332,49	32,72	12,04	3,33	40,85	0,33	10,73
	10	202,70	30,93	11,38	3,14	43,50	0,33	10,71

U sastavu čvrste faze nakon kiselinske predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri temperaturama od 160 do 200 °C i vremenu zadržavanja od 1 do 10 minuta udio glukana kreće se u rasponu od 26,45 % do 42,63 % odnosno najmanji udio glukana u iznosu od 26,45 % određen je predobradom pšenične slame pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 1 min dok je najveći udio glukana u iznosu od 42,63 % određen pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 1 min. Navedene rezultate odnosno slabu hidrolizu celuloze potvrđuju i niska iskorištenja glukoze u tekućem dijelu hidrolizata (Tablica 12.). Najveće iskorištenje hidrolize glukoze postignuto je predobradom pšenične slame pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min i iznosi samo 11,17 %. Dobiveni rezultati mogu se objasniti specifičnom strukturom celuloze. Molekule celuloze najčešće sadržavaju od 2 000 do 20 000 glukoznih jedinica. Dugi paralelni lanci povezani su vodikovim i van der Waalsovima silama koje daju celulozi visok stupanj molekulske uređenosti. Agrerirane molekule celuloze tvore mikrovlakna koja su međusobno povezana i tvore vlakna. Vlaknasta struktura i intermolekulske veze čine celulozu otpornom na mehaničko rastezanje, slabo topljivom u otapalima i otpornom na enzimsku hidrolizu s celulazama (Ivančić Šantek i sur., 2016). Glavni udio celuloze čini kristalična celuloza, dok samo mali udio zauzima amorfna celuloza, stoga se celuloza smatra visokokristaličnim materijalom (Satimanont, 2012). Veliki broj vodikovih veza odgovoran je za visok stupanj kristaličnosti native celuloze. Manji dio celuloze je u amorfnom obliku i podložniji enzimskoj hidrolizi od kristalične celuloze (Henriks i Zeeman, 2009; Laureano-Perez i sur., 2005). Celuloza je netopiva u konvencionalnim otapalima i vrlo otporna na kemijske metode predobrade kao što je kiselinska hidroliza (Rinaldi i Scüth, 2009). Udio ksilana nakon kiselinske predobrade kreće se u rasponu od 6,71 % do 19,64 %. Najmanji udio ksilana u iznosu od 6,71 % određen je predobradom pšenične slame pri temperaturi od 160 °C i vremenu zadržavanja od 10 min dok je najveći udio ksilana (1,94 %) određen pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 10 min. Udio ksilana u sastavu čvrste faze hidrolizata nakon kiselinske predobrade u visokotlačnom reaktoru značajno je manji od udjela glukana. Razlog tomu je razgranata i amorfna struktura hemiceluloze koja je podložnija hidrolizi od celuloze kako je ranije objašnjeno. Na veći udio glukana u sastavu čvrste faze hidrolizata ukazuju i bolja iskorištenja ksiloze u odnosu na iskorištenje glukoze (Tablica 12.). Maksimalno iskorištenje glukoze dobiveno je predobradom pšenične slame pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min i iznosi 11,71 %, a maksimalno iskorištenje ksiloze pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 1 min i iznosi čak 44,24 % (Tablica 12.). Pri navedenim uvjetima također je postignuto maksimalno iskorištenje ukupnih ugljikohidrata u tekućem dijelu hidrolizata u iznosu od 23,83 %. U čvrstoj fazi

hidrolizata također su određeni udjeli arabinana u rasponu od 0,00 % do 9,01 %. Udjeli arabinana su relativno niski. Pri većim temperaturama, vremenima zadržavanja i koncentraciji kiseline tijekom kiselinske predobrade oslobađa se veća količina arabinoze. Najveći udio arabinana postignut je pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 10 min u iznosu od 9,01 %. Daljnim povećanjem temperature udio arabinana pada te pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 10 min iznosi samo 3,14 %. Pri velikim temperaturama i vremenima zadržavanja arabinan se razgrađuje brže od ksilana (Hu i sur., 2010; Gunnarsson i sur., 2008). Lignin netopiv u kiselini (LNTK) i pepeo određeni su i u čvrstoj fazi te je određen njihov zajednički udio koji se kreće u rasponu od 30,99 % do 43,50 %. Najveći udio LNTK u iznosu od 43,50 % određen je pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 10 min. Udio lignina topivog u kiselini (LTK) podjednak je za sve uvjete predobrade i kreće se u rasponu od 0,24 % do 0,26 % te je zanemariv. Nusproizvodi, osim mravlje kiseline, su potpuno izostali iz čvrste faze hidrolizata. U postupku kiselinske predobrade pšenične slame pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 10 min dobiven je najveći udjel mravlje kiseline u iznosu od 10,71 %. Mogući razlog je da nakon predobrade i provođenja dvostupanjske kiselinske hidrolize čvrsta faza nije isprana dovoljnom količinom vruće vode.

Na slici 12. prikazan je čvrsti dio hidrolizata pšenične slame dobiven kod različitih uvjeta predobrade u visokotlačnom reaktoru. Kao što se vidi na slici 12. promjena intenziteta boje i teksture hidrolizata ovisi o temperaturi i vremenu zadržavanja. Može se opaziti da na intenzitet boje čvrstog dijela hidrolizata veći utjecaj ima temperatura predobrade u odnosu na vrijeme zadržavanja. Najsvjetlija boja čvrstog dijela hidrolizata postignuta je pri temperaturi predobrade od 160 °C, dok je najtamnija boja postignuta pri temperaturi predobrade od 200 °C.



Slika 12. Čvrsti dio hidrolizata pšenične slame pri ovim uvjetima predobrade: a) temperature od 160 °C, 180 °C, 200 °C (s lijeva na desno) i vremenu zadržavanja od 1 minute b) temperature od 160 °C, 180 °C, 200 °C (s lijeva na desno) i vremenu zadržavanja od 10 minuta.

4.2. ŠARŽNI ANAEROBNI UZGOJ KVASCA *Saccharomcey cerevisiae* (DIVLJI TIP) I GENETIČKI MODIFICIRANOG KVASCA *Saccharomyces cerevisiae* Y9 NA HIDROLIZATU PŠENIČNE SLAME U ERLENMEYER TIKVICAMA

U ovom dijelu istraživanja provedena su preliminarna istraživanja anaerobnog uzgoja kvasaca *S. cerevisiae* (divlji tip) i genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9, koji može koristiti pentoze, na hidrolizatu pšenične slame dobivenom kiselinskom predobradom u visokotlačnom reaktoru. Rezultati šaržnog anaerobnog uzgoja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (divlji tip) na hidrolizatu pšenične slame prikazani su na slikama 13 i 14., a rezultati šaržnog anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y9 prikazani na slikama 15. - 22.. Sastav korištene lignocelulozne sirovine, odnosno pšenične slame, prikazan je u tablici 9. Za anaeroban uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (divlji tip) i genetički modificiranog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama korišteni su tekući dijelovi hidrolizata dobiveni predobradom pšenične slame pri određenim uvjetima. Za anaeroban uzgoj kvasca *S. cerevisie* (divlji tip) korišteni su tekući dijelovi hidrolizata dobiveni predobradom pšenične slame pri različitim uvjetima kao što je prikazano u tablici 14..

Tablica 14. Sastav tekućeg dijela hidrolizata nakon kiselinske predobrade pšenične slame pri različitim procesnim parametrima za anaerobni uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (divlji tip) i genetički modificiranog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama.

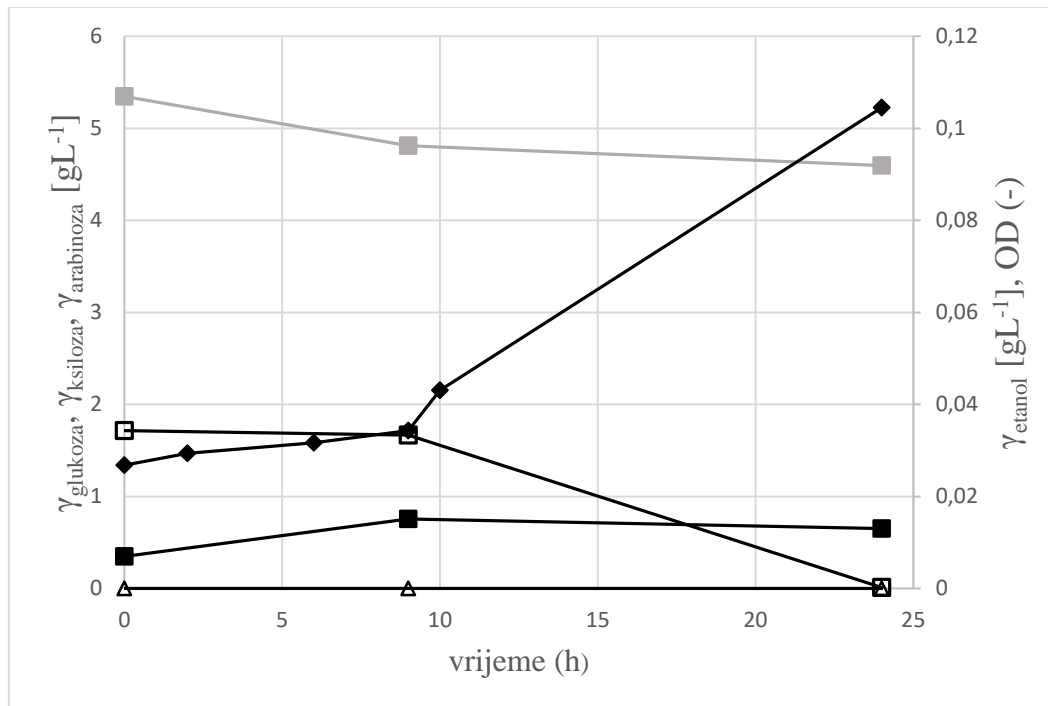
Uvjeti predobrade	γ glukoza [gL ⁻¹]	γ ksiloza [gL ⁻¹]	γ arabinoza [gL ⁻¹]	γ furani [gL ⁻¹]	γ mravlja kiselina [gL ⁻¹]	γ octena kiselina [g ^l -1]	γ levulinska kiselina [gL ⁻¹]
PS/160 °C/5 min/2, 00 % H ₃ PO ₄	2,35	9,07	1,65	0,14	0,72	0,76	0,00
PS/160 °C/10 min/2, 00 % H ₃ PO ₄	3,75	6,08	1,24	0,052	0,83	0,73	0,00
PS/180 °C/1 min/2, 00 % H ₃ PO ₄	3,86	9,24	1,69	0,37	0,95	1,03	0,00
PS/180 °C/10 min/2, 00 % H ₃ PO ₄	4,23	8,00	1,52	0,39	1,02	1,03	0,00
PS/200 °C/5 min/2, 00 % H ₃ PO ₄	5,55	2,96	0,62	0,85	1,11	0,82	0,16
PS/200 °C/10 min/2, 00 % H ₃ PO ₄	4,09	3,12	0,56	1,03	0,86	0,98	0,13

Međusobna usporedba uspješnosti anaerobnog uzgoja različitih sojeva kvasca (divlji soj kvasca *S. cerevisiae* i genetički modificirani soj kvasca *S. cerevisiae* Y9) izvršena je na osnovi pokazatelja uspješnosti bioprocasa kao što su: stupanj konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$), učinkovitost (E) i produktivnost (Pr) procesa. Tijekom preliminarnih istraživanja pogodnosti uporabe tekućeg dijela hidrolizata pšenične slame za šaržni anaerobni uzgoj utvrđeno je da je nužan dodatak anorganskog izvora dušika i fosfora te kvašćevog ekstrakta, a da bi se pospješio rast biomase kvasca.

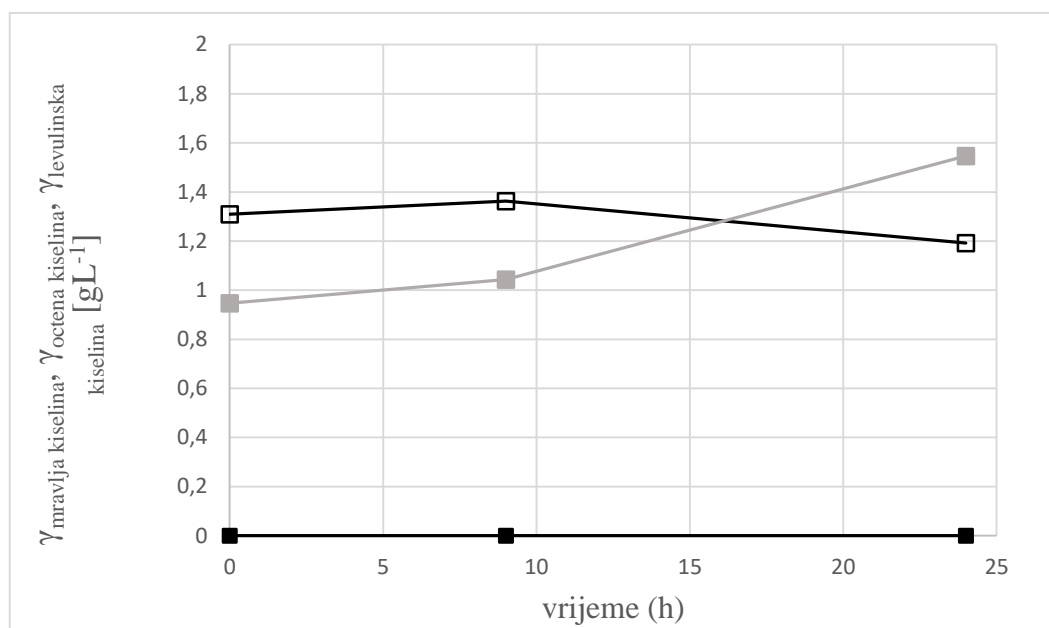
4.2.1. Šaržni anaerobni uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (divlji tip) na hidrolizatu pšenične slame u Erlenmeyer tikvicama

Kvasac *S. cerevisiae* najčešće se primjenjuje u komercijalnoj proizvodnji zbog visokog prinosa etanola (= 0,45 – 0,50 grama etanola po gramu glukoze), visoke produktivnosti (2-5 g⁻¹L⁻¹h⁻¹), sposobnosti rasta pri visokim koncentracijama šećera i etanola. Maksimalan teoretski prinos za heksoze, odnosno pentoze je 0,511 kg etanola i 0,0489 kg CO₂ po kg šećera (Kang i sur., 2014). Nadalje, kvasac *S. cerevisiae* ima status GRAS (eng. Generally Recognized As Safe) što značajno pojednostavljuje proces proizvodnje (Ivančić Šantek i sur., 2016). Kvasac *S. cerevisiae* (divlji soj) ima sposobnost rasta na glukozi, fruktozi, saharozi i maltozi, ali ne i na pentozama kao npr. ksilozi. Prema istraživanju Mušak, 2016. pokazano je da odabrani divlji soj kvasca, koji je korišten u ovom istraživanju, ima sposobnost sinteze etanola tijekom anaerobnog rasta na hidrolizatima dobivenim kiselinskom predobradom pšenične slame. Također je utvrđeno da taj divlji soj kvasca ne troši ksilozu i arabinozu tijekom rasta.. Na temelju literaturnih podataka o metaboličkoj sposobnosti divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* za šaržni anaerobni uzgoj odabrani su tekući dijelovi hidrolizata pšenične slame dobiveni predobradom pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 1 min odnosno pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min. Tekući dio hidrolizata dobiven predobradom pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 1 minute odabaran je za provođenje anaerobnog uzgoja kvasca zbog najveće koncentracije šećera (glukoze - 27,33 gL⁻¹) prisutne u tom hidrolizatu. Osim sposobnosti korištenja monosaharida i sinteze etanola, u ovom dijelu istraživanja ispitan je i utjecaj inhibitora na sposobnost rasta i sintezu etanola kod divljeg soja kvasca *S. cerevisiae*. U svrhu ispitivanja inhibitornog djelovanja odabran je tekući dio hidrolizata dobiven predobradom pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min. Hidrolizat s povećanom koncentracijom ukupnih furana je odabran zbog činjenice da je u prethodnim

istraživanjima uočeno da divlji soj kvasca može rasti na koncentracijama ukupnih furana do 1 gL^{-1} (Mušak, 2016.). Rezultati anaerobnog uzgoja divljeg soja kvasca *S.cerevisie* na hranjivoj podlozi s tekućim dijelom hidrolizata dobivenih predobradom pšenične slame pri temperaturi od $180 \text{ }^\circ\text{C}$ i vremenu zadržavanja od 1 min odnosno pri temperaturi $200 \text{ }^\circ\text{C}$ i vremenu zadržavanja od 5 min prikazani su na slikama 13. i 14.



Slika 13.a. Promjena koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare) arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare), etanola (γ_{EtOH} , Δ) odnosno optičke gustoće (OD_{600} , \blacklozenge) na hidrolizatu pšenične slame ($180 \text{ }^\circ\text{C}/1 \text{ min}/ 2,0 \text{ } \%$ H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama.

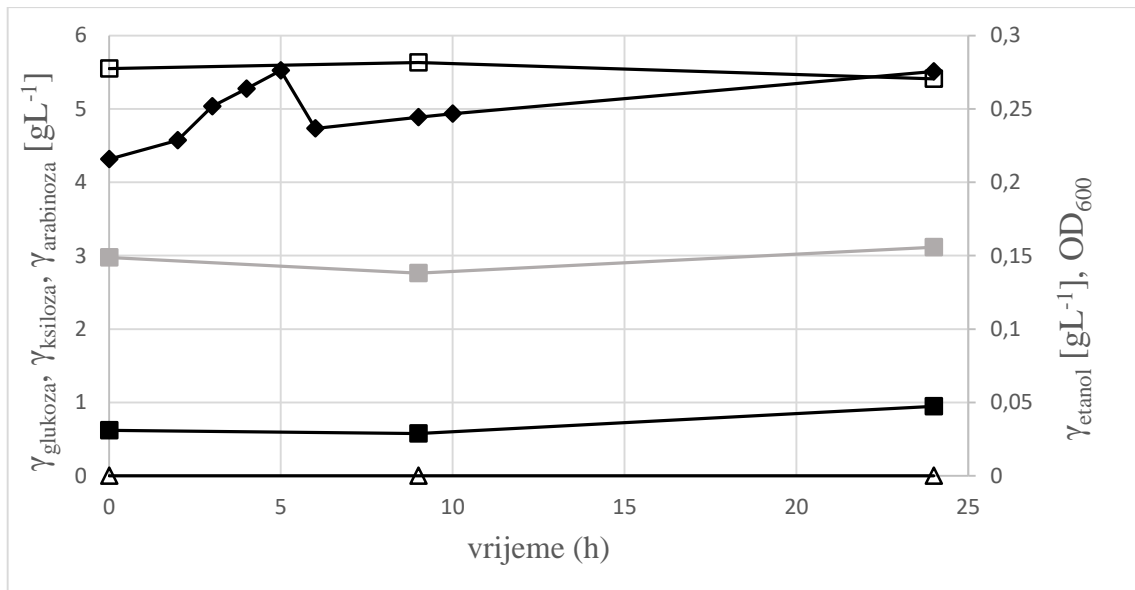


Slika 13.b. Promjena koncentracije mravlje (γ_{MK} , \square), octene (γ_{OK} , \blacksquare), levulinske (γ_{LK} , \blacksquare) kiseline na hidrolizatu pšenične slame (180 °C/ 1 min/ 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama.

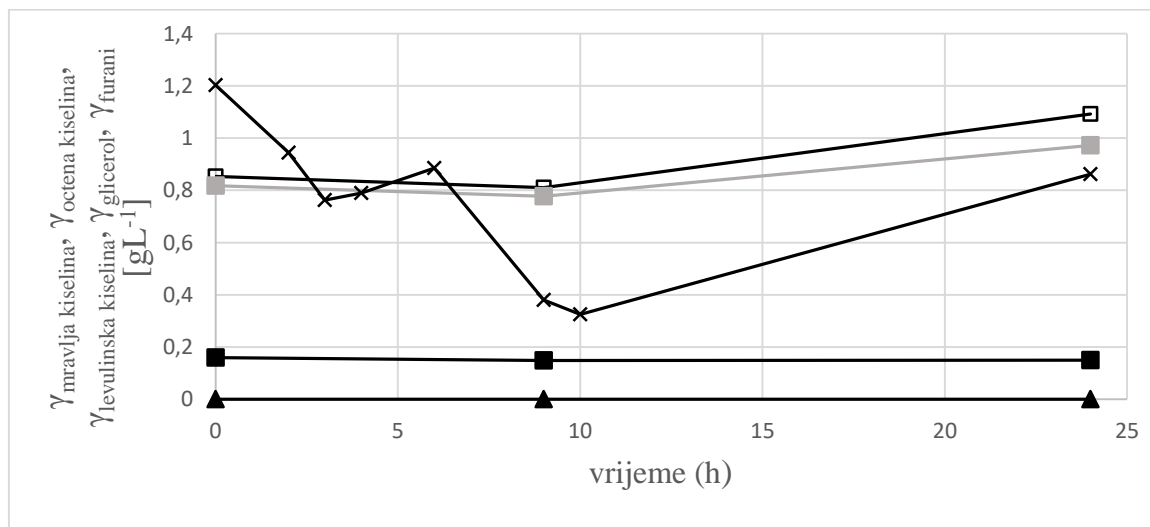
Koncentracija ukupnih šećera (glukoza, ksiloza i arabinoza) u hranjivoj podlozi na početku bioprocasa iznosila je $14,79 \text{ g L}^{-1}$ od čega je koncentracija glukoze bila u iznosu od $3,86 \text{ g L}^{-1}$. Do 9 sata uzgoja zabilježene su male promjene koncentracije glukoze odnosno u 9 satu uzgoja koncentracija glukoze pala je sa početnih $1,71 \text{ g L}^{-1}$ na $1,67 \text{ g L}^{-1}$. To je razdoblje lag – faze rasta ili faze prilagodbe rasta. Naime, jednostanični mikroorganizmi (bakterije i kvasci) ne počinju se odmah razmnožavati kada se nacijepu na hranjivu podlogu, jer je potrebno određeno vrijeme da se stanice priviknu na okolinu. Pri tome stanice povećavaju svoj volumen, sintetiziraju enzime i međuprodukte potrebne za rast i razmnožavanje. Kvasac je počeo intenzivnije metabolizirati glukoze iz hranjive podloge tek nakon 9 sata uzgoja kada koncentracije glukoze počinje naglo padati. Početnu nisku potrošnju glukoze potvrđuje i značajniji rast promjene koncentracije mikrobne biomase. Do 9 sata uzgoja kvasca *S. cerevisiae* nije zabilježen značajniji rast kvašćeve biomase. Tek nakon 9. sata uzgoja kvasac počinje intenzivnije rasti što potvrđuje i nagli rast optičke gustoće (OD, Slika 13.a.). Nakon 24. sata uzgoja koncentracija glukoze iznosila je $0,01 \text{ g L}^{-1}$. Tijekom uzgoja kvasca nije zabilježena sinteza etanola odnosno koncentracija etanola tijekom cijelog vremena trajanja uzgoja iznosila je 0 g L^{-1} . Početne koncentracije octene odnosno mravlje kiseline iznosile su $0,95 \text{ g L}^{-1}$ odnosno $1,31 \text{ g L}^{-1}$. Prema literaturnim podacima navedene koncentracije octene i mravlje kiseline nisu inhibirajuće za rast kvasaca *S. cerevisiae*. Prema istraživanjima Casey i sur., (2010) octena

kiselina prisutna u hranjivoj podlozi u rasponu koncentracija od 7,5 do 15 gL⁻¹ pri pH 5-6 djelovala je inhibirajuće na kvasac drastično smanjujući rast kvasca *S. cerevisiae*. S obzirom na niske koncentracije octene i mravlje kiseline dobivene ovim eksperimentom može se zaključiti da izostanak sinteze etanola nije povezan s koncentracijom inhibitora. Izostanak sinteze etanola može se objasniti niskim koncentracijama šećera i sinergističkim djelovanjem inhibitora. Nakon 24. sata uzgoja koncentracija octene odnosno mravlje kiseline iznosile su 1,55 gL⁻¹, odnosno 1,19 gL⁻¹. Slabe kiseline, kao što su octena, mravlja i levulinska kiselina, u većim koncentracijama mogu inhibirati rast kvasca. Nedisocirane slabe kiseline su liposolubilne i mogu difundirati u plazminu membranu. U citosolu disocijacija slabih kiselina odvija se pri neutralnoj, citosolnoj pH vrijednosti što rezultira povišenjem citosolnog pH što rezultira inhibicijom proliferacije stanica kvasca. Stoga je zadržavanje neutralne citosolne pH vrijednosti od velike važnosti za održavanje stanične vijabilnosti (Imai i Ohono, 1995). Koncentracija nedisociranog oblika slabih kiselina u hidrolizatu lignoceluloznih sirovina ovisi o vrijednosti pH stoga se pH smatra ključnim parametrom tijekom provođenja procesa fermentacije (Palmqvist i Hägerdal, 2000). Optimalna pH vrijednost za rast kvasca *S. cerevisiae* je u rasponu od 5,0 do 5,5. Levulinska kiselina tijekom cijelog vremena trajanja uzgoja nije detektirana. Potrošnja supstrata (ΔS) iznosi 1,71 gL⁻¹. S obzirom na izostanak sinteze etanola ostali pokazatelji uspješnosti odnosno prinos produkta (Y_P), stupanj konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$), produktivnost (Pr) te efikasnost (E) nisu se mogli odrediti (Tablica 14.).

Rezultati anaerobnog uzgoja divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* na hranjivoj podlozi s tekućim dijelom hidrolizata dobivenim predobradom pšenične slame pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min prikazani su na slici 14.



Slika 14.a. Promjena koncentracije glukoze (γ_{glc} , □), ksiloze (γ_{ksi} , ■), arabinoze (γ_{arab} , ■), etanola (γ_{EtOH} , Δ) odnosno optičke gustoće (OD_{600} , ◆) na hidrolizatu pšenične slame (200 °C/ 5 min/ 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama.

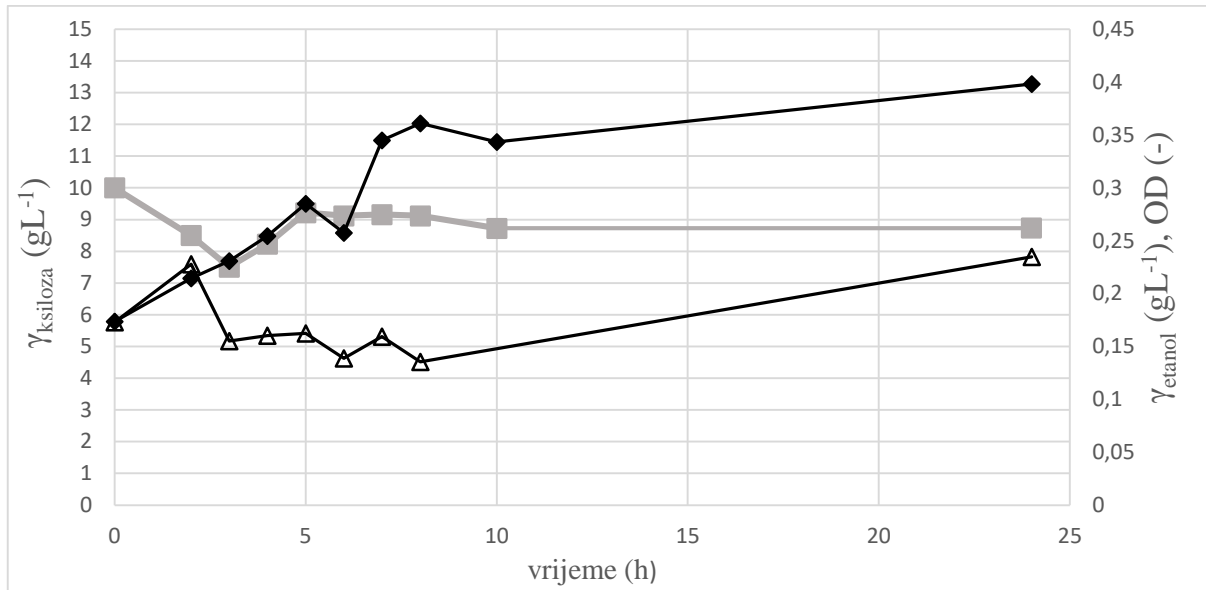


Slika 14.b. Promjena koncentracije mravlje (γ_{MK} , □), octene (γ_{OK} , ■), levulinske (γ_{LK} , ■) kiseline, glicerola (γ_{glic} , ▲) i furana (γ_{fur} , ×) na hidrolizatu pšenične slame (200 °C/ 5 min 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* u Erlenmeyer tikvicama.

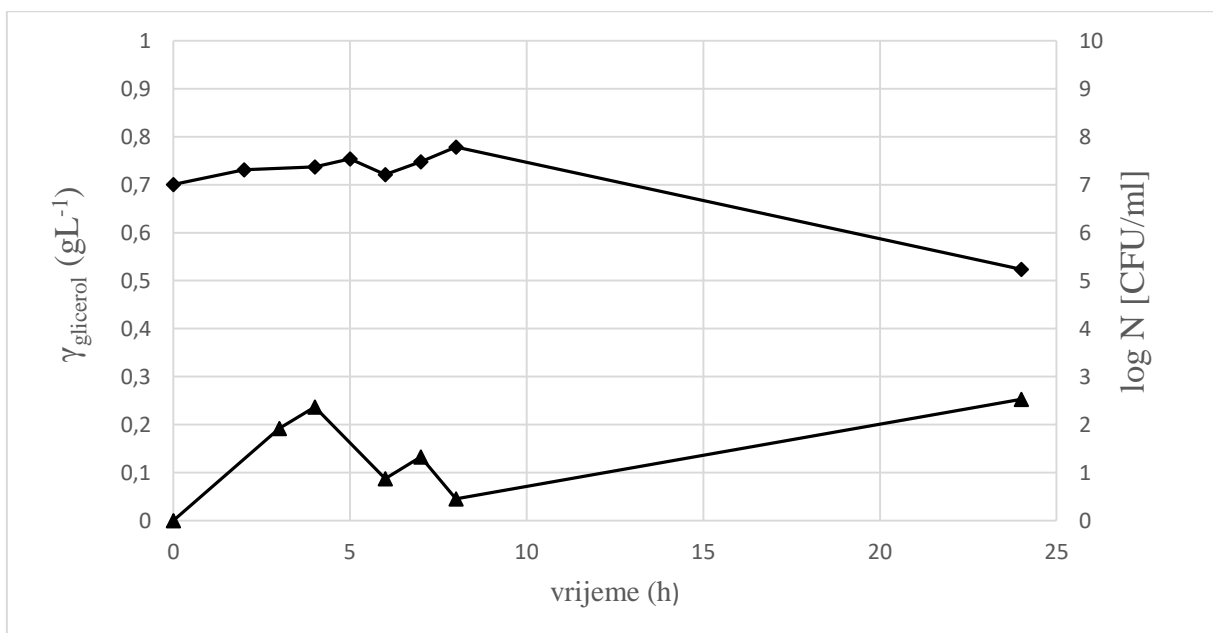
Koncentracija ukupnih šećera na početku procesa anaerobnog uzgoja divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* na hidrolizatu dobivenom predobradom pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min iznosila je 9,13 gL⁻¹. U usporedbi s uzgojem kvasca na hidrolizatu dobivenim predobradom pšenične slame pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 1 min potrošnje glukoze iznosi 0,15 gL⁻¹. U prvih 9 sati uzgoja kvasac *S. cerevisiae* nije trošio glukozu, a potom se koncentracije glukoze počinje smanjivati. Početna koncentracija glukoze iznosila je 5,55 gL⁻¹, dok je nakon 24 sata uzgoja koncentracija glukoze iznosila 5,41 gL⁻¹. Tijekom 24 sata uzgoja koncentracija ksiloze nije se mjenjala. Porast koncentracije ksiloze i arabinoze nakon 9. sata uzgoja posljedica je analitičkih pogrešaka. Razlog smanjene potrošnje glukoze u odnosu na prethodni eksperiment je veća koncentracija nastalih inhibitora pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min u odnosu na temperaturu od 180 °C i vrijeme zadržavanja od 1 min (Tablica 14.). Više koncentracije ukupnih furana smanjuju specifičnu brzinu rasta stanica kvasca te specifičnu brzinu proizvodnje etanola (Palmqvist i Hägerdal, 2000). Na povećane koncentracije furana osjetljiviji je rast kvasca nego sinteza etanola (Palmqvist i sur., 1999). Furan aldehidi inhibiraju proces fermentacije smanjenjem enzimske aktivnosti i oštećenjem stanice kvasca (Allan i sur., 2010; Sanchez i Bautista, 1988). Nakon 6. sata uzgoja vidljivo je smanjenje koncentracije ukupnih furana. Stanice kvasca mogu reducirati furfural do furfural alkohola u procesu fermentacije što rezultira produženom lag fazom tijekom alkoholne fermentacije (Ko i sur., 2015). Tijekom anaerobnih uzgoja kvasac *S. cerevisiae* može konvertirati furfural do furfural alkohola i HMF do 2,5-bis-hidroksimetilfurana. Osim furfurala zabilježene su i koncentracije octene, mravlje i levulinske kiseline koje su tijekom 24 sata uzgoja bile konstantne (Slika 14.b.). U usporedbi s prethodnim uzgojem (180 °C i vrijeme zadržavanja 1 min) registrirana je i prisutnost levulinske kiseline (0,15 gL⁻¹). Koncentracija levulinske kiseline tijekom 24 sata uzgoja je bila konstantna. Isto kao i u prethodnom eksperimentu s obzirom na izostanak sinteze etanola pokazatelji uspješnosti odnosno prinos produkta (Y_P), stupanj konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$), produktivnost (Pr) te efikasnost (E) nisu mogli biti zračunati (Tablica 15.).

4.2.1. Šaržni anaerobni uzgoj genetički modificiranog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y9 na hidrolizatu pšenične slame u Erlenmeyer tikvicama

U ovom dijelu istraživanja prikazan je šaržni anaerobni uzgoj genetički modificiranog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y9 na hidrolizatu pšenične slame u Erlenmeyer tikvicama. Rezultati uzgoja prikazani su na slikama 15. - 22.. U ovom dijelu istraživanja koristio se genetički modificiran soj kvasca *S. cerevisiae* Y9 koji se od divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* razlikuje po tome što uz sposobnost metaboliziranja heksoza također ima sposobnost metaboliziranja pentoza (ksiloza i arabinoza). Za adekvatnu usporedbu anaerobnog uzgoja kvasca *S. cerevisiae* Y9 na hranjivoj podlozi dobivenoj od hidrolizata predobrađenih lignoceluloznih sirovina koristile su se dvije kontrolne podloge koje su pripremljene kako je opisano u poglavlju 3.1.3.2. (Tablica 3.). Prva kontrolna podloga sadržavala je glukozu i ksilozu, dok je druga kontrolna podloga sadržavala samo ksilozu u koncentracijama sličnima kao kod hidrolizata pšenične slame. Uzgojem kvasca *S. cerevisiae* Y9 na prvoj kontrolnoj podlozi željela se ispitati sposobnost kvasca da metabolizira ksilozu u prisustvu glukoze, dok se provođenjem uzgoja kvasca *S. cerevisiae* Y9 na drugoj kontrolnoj podlozi željela ispitati sposobnost kvasca da metabolizira pentoze odnosno ksilozu. Rezultati anaerobnog uzgoja genetički modificiranog soja kvasca Y9 na kontrolnoj podlozi koja sadrži samo ksilozu prikazani su na slici 15. dok su rezultati uzgoja istog kvasca na kontrolnoj podlozi koja sadrži samo glukozu i ksilozu prikazani na slici 16..

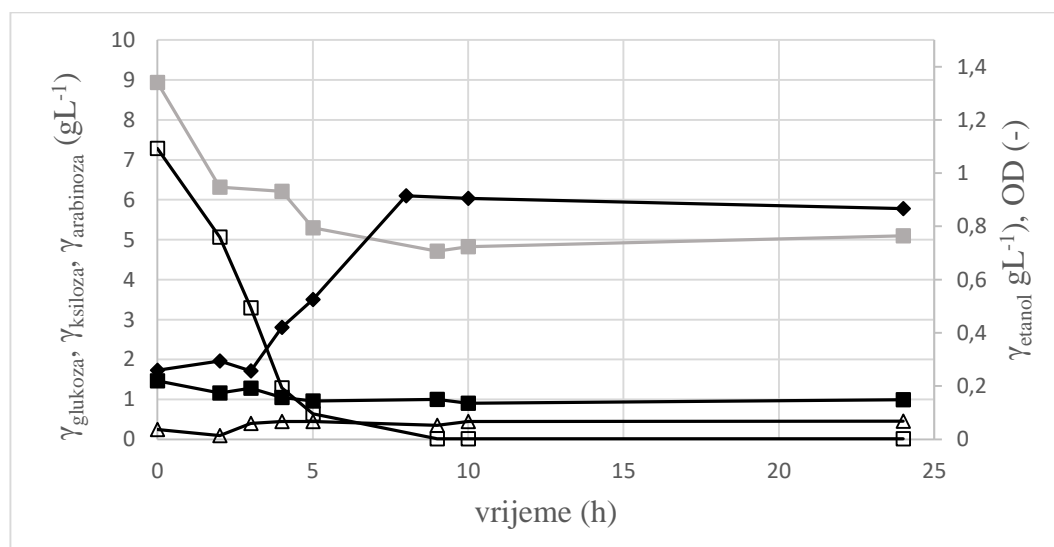


Slika 15.a. Promjena koncentracije ksiloze (γ_{ksi} , ■) i etanola (γ_{EtOH} , Δ) odnosno optičke gustoće (OD_{600} , ◆) u kontrolnoj podlozi koja sadrži ksilozu tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama.

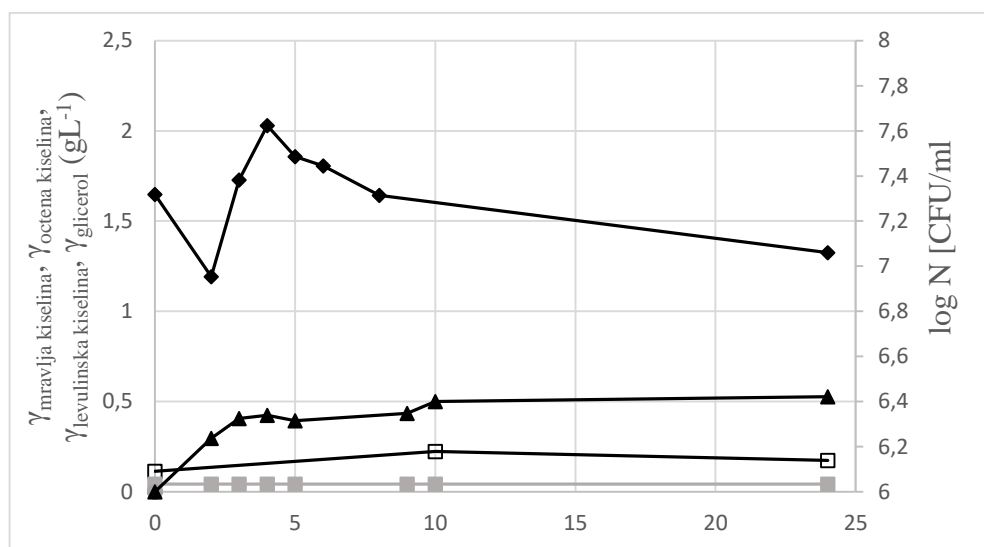


Slika 15.b. Promjena koncentracije glicerola (γ_{glic} , ▲) i broja živih stanica ($\log N$; ◆) u kontrolnoj podlozi koja sadrži ksilozu tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama.

Iz rezultata je vidljivo da genetički modificirani soj kvasca, Y9 ima sposobnost metaboliziranja ksiloze. Na početku uzgoja početna koncentracija ksiloze iznosila je 10 gL^{-1} , dok je nakon 24. sata uzgoja koncentracija ksiloze iznosila $8,72 \text{ gL}^{-1}$. Sposobnost metaboliziranja pentoza potvrđuju i rezultati određivanja optičke gustoće hranjive podloge na 600 nm (OD_{600}) (Slika 15.a.) i broj živih stanica ($\log N$) (Slika 15.b.). Prvih 8 sati uzgoja promjene optičke gustoće (OD_{600}) su u skladu s promjenama broja živih stanica kvasca ($\log N$). Zabilježena određena odstupanja vjerojatno su posljedica analitičkih pogrešaka. Osim proizvodnje etanola tijekom uzgoja genetički modificiranog soja kvasca, Y9 zabilježena je i sinteza glicerola. Osim etanola i CO_2 tijekom alkoholne fermentacije nastaju različiti nusprodukti metabolizma kao što su glicerol, organske kiseline i viši alkoholi. Glicerol ima važnu fiziološku ulogu u regulaciji osmotskog tlaka u stanici kvasca te se za njegovu sintezu utroši do 4 % šećera u podlozi (Ivančić Šantek i sur., 2016). Koncentracija etanola u podlozi nakon 24 sata uzgoja iznosila je $0,23 \text{ gL}^{-1}$ dok je koncentracija glicerola na kraju uzgoja iznosila $0,25 \text{ gL}^{-1}$. Potrošnja supstrata (ΔS) iznosi $1,38 \text{ gL}^{-1}$, prinos produkta odnosno etanola (Y_P) iznosi $0,06 \text{ gL}^{-1}$ dok stupanj konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$) iznosi $0,05 \text{ gg}^{-1}$. Produktivnost odnosno efikasnost procesa iznosili su $0,03 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ odnosno 9,8 % .



Slika 16.a. Promjena koncentracije glukoze (γ_{glc} , □), ksiloze (γ_{ksi} , ■), arabinoze (γ_{arab} , ■), i etanola (γ_{EtOH} , Δ) odnosno optičke gustoće (OD_{600} , ◆) u kontrolnoj podlozi koja sadrži glukozu i ksilozu tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama.

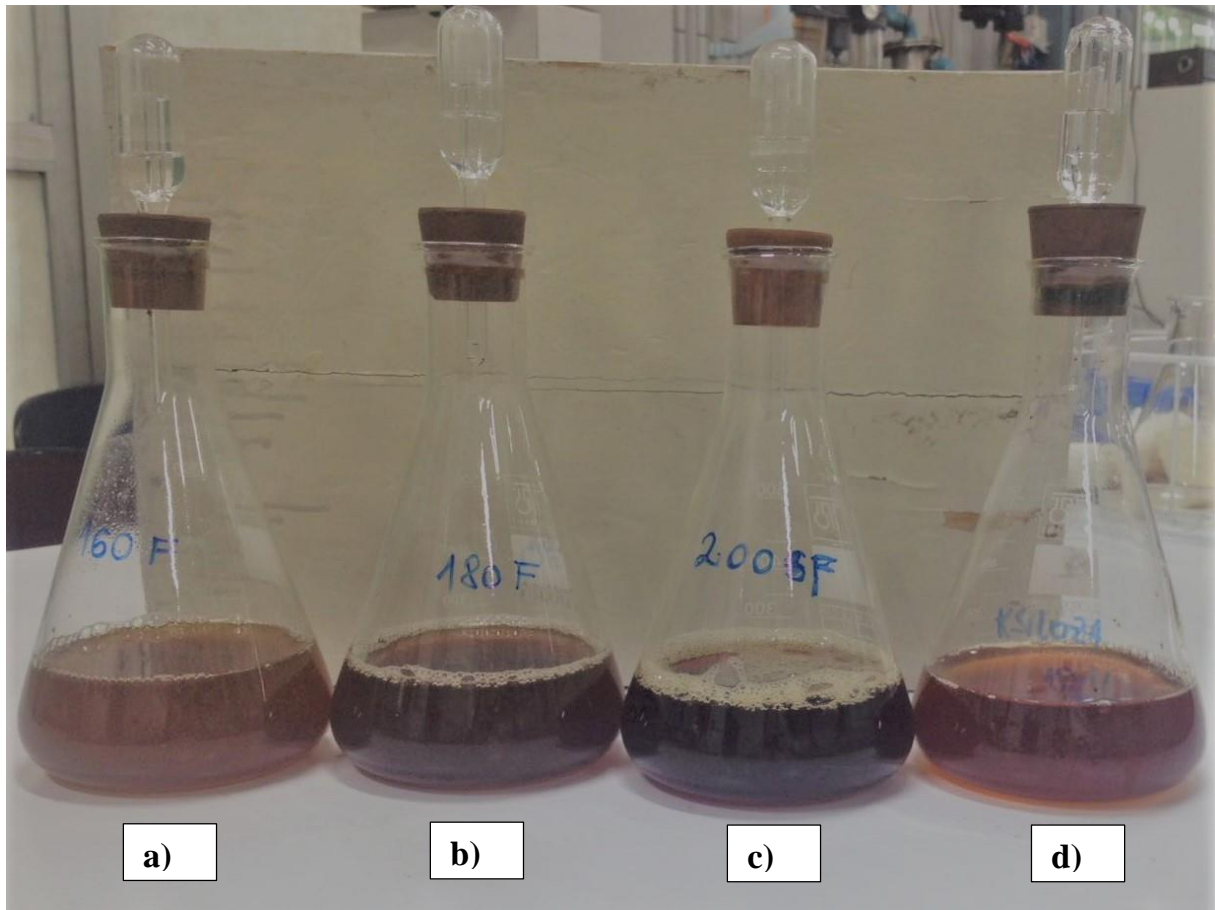


Slika 16.b. Promjena koncentracije mravlje (γ_{MK} , □), octene kiseline (γ_{OK} , ■), glicerola (γ_{glic} , ▲), i broja živih stanica ($\log N$; ◆) u kontrolnoj podlozi koja sadrži glukozu i ksilozu tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama

U ovom istraživanju proveden je i šaržni anaerobni uzgoj genetički modificiranog soja kvasca Y9 u podlozi koja osim glukoze sadrži i ksilozu (Slika 16.a. i 16.b.). Početne koncentracije glukoze odnosno ksiloze bile su jednake i iznosile su 10 gL^{-1} . Iz rezultata potrošnje supstrata vidljiv je diauksijalni rast kvasca, gdje se najprije troši glukoza nakon čega slijedi potrošnja ksiloze. Nakon 9 sati uzgoja sva glukoza u hranjivoj podlozi je potrošena i slijedi brža potrošnja ksiloze odnosno brzina potrošnje supstrata iznosi $1,41 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Koncentracija ksiloze nakon 24 sata uzgoja iznosila je $5,09 \text{ gL}^{-1}$. Početan broj živih stanica iznosi $2,08 \cdot 10^7 \text{ CFUmL}^{-1}$ dok broj živih stanica nakon 24 sata uzgoja iznosi $1,15 \cdot 10^7 \text{ CFUmL}^{-1}$. Koncentracije toksičnih spojeva (mravlje, octene kiseline i furana) su relativno konstantne dok levulinska kiselina tijekom uzgoja nije niti detektirana. Konačna koncentracije etanola iznosila je $0,46 \text{ gL}^{-1}$ s produktivnošću procesa od $0,008 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ i učinkovitosti procesa od 3,93 %.

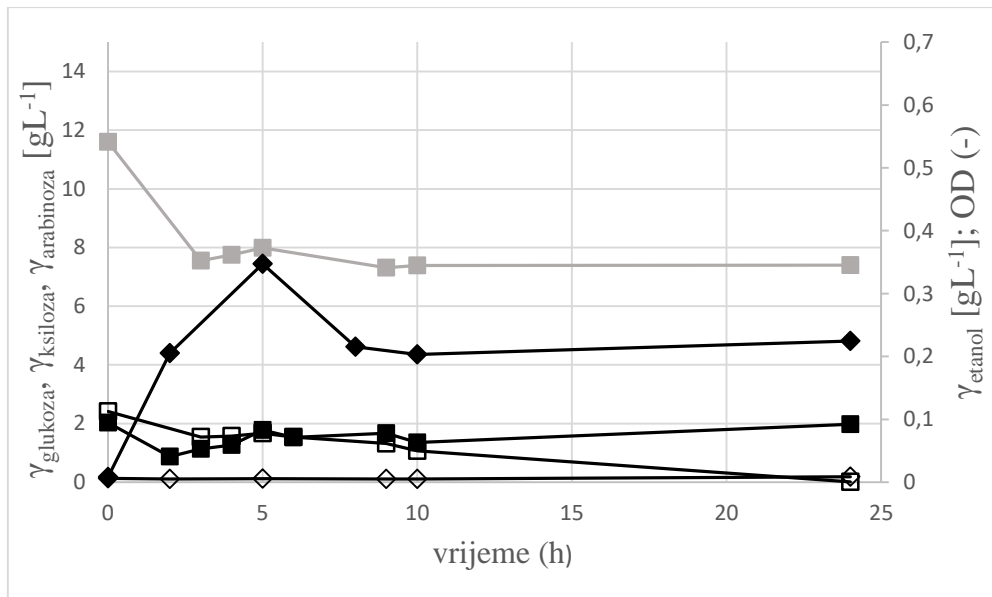
U ovom istraživanju proveden je i anaerobni uzgoj genetički modificiranog soja kvasca na hidrolizatima dobivenima predobradom pšenične slame pri svim temperaturama predobrade ($160 \text{ }^\circ\text{C}$, $180 \text{ }^\circ\text{C}$, $200 \text{ }^\circ\text{C}$) i različitim vremenima zadržavanja (Slika 17.). Za temperaturu predobrade pri $160 \text{ }^\circ\text{C}$ odabrani su hidrolizati pšenične slame dobiveni

predobradom pri vremenima zadržavanja od 5 i 10 minuta s obzirom da su pri tim uvjetima dobivene najveće koncentracije ukupnih šećera. Pri temperaturi od 160 °C i vremenu zadržavanja od 5 min odnosno 10 min ukupne koncentracije šećera u hidrolizatima iznosile su 13,07 gL⁻¹ odnosno 11,08 gL⁻¹. Pri temperaturi 180 °C odabran je hidrolizat pšenične slame dobiven predobradom pri vremenu zadržavanja od 10 minuta zbog najmanje koncentracije ukupnih furana prisutne u tom hidrolizatu (0,36 gL⁻¹). Nadalje, kod temperature od 180 °C u hidrolizatima je ukupna koncentracija šećera bila na približno istoj razini kod svih vremena zadržavanja. Od 200 °C odabrani su hidrolizati pšenične slame dobiveni pri vremenu zadržavanja od 5 (19,13 gL⁻¹) i 10 (7,77. gL⁻¹) minuta zbog prisutnosti najvećih koncentracija ukupnih šećera u tim hidrolizatima. Osim toga pri navedenim uvjetima dobivene su najniže koncentracije ukupnih furana koje su iznosile 0,85 gL⁻¹ odnosno 1,03 gL⁻¹. Potrošnja supstrata (ΔS) iznosila je 11,69 gL⁻¹ te je za 90 % veća u odnosu na šaržni uzgoj genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 na podlozi koja sadrži samo ksilozu. Ostali pokazatelji uspješnosti procesa su također veći te iznose: stupanj konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$) = 0,05 gg⁻¹, produktivnost (Pr) = 0,03 gL⁻¹, efikasnost (E) = 9,8 %.

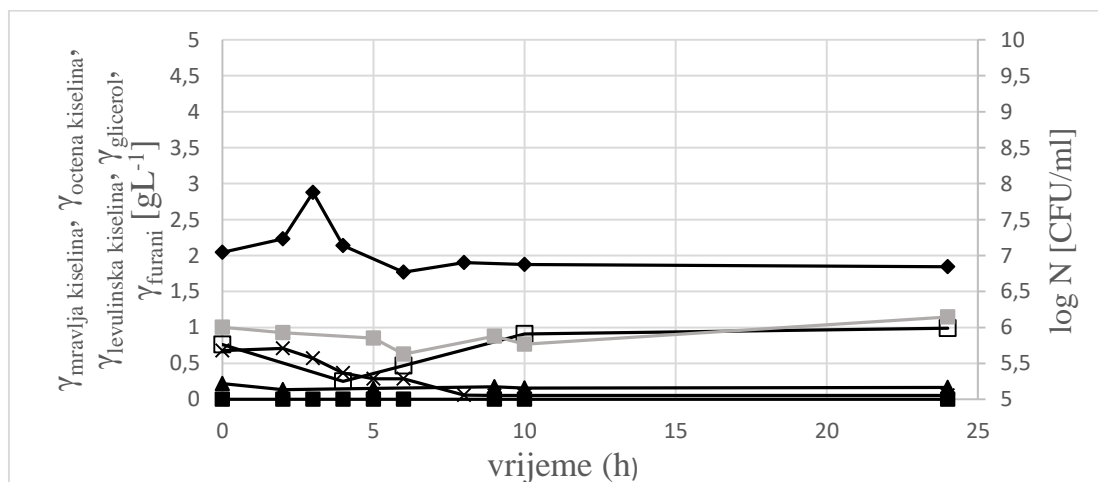


Slika 17. Hidrolizati dobiveni predobradom pšenične slame pri uvjetima a) temperatura od 160 °C, vrijeme zadržavanja 10 min, koncentracija fosforne kiseline 2,0 % b) temperatura od 180 °C, vrijeme zadržavanja 10 min, koncentracija fosforne kiseline 2,0 % c) temperatura od 200 °C, vrijeme zadržavanja 10 min, koncentracija fosforne kiseline 2,0 % i kontrolna podloga koja sadrži samo ksilozu (d))

Rezultati anaerobnog uzgoja genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae*, Y9 na hranjivoj podlozi s tekućim dijelom hidrolizata dobivenih predobradom pšenične slame pri temperaturi od 160 °C i vremenu zadržavanja od 5 min prikazani su na slici 18..



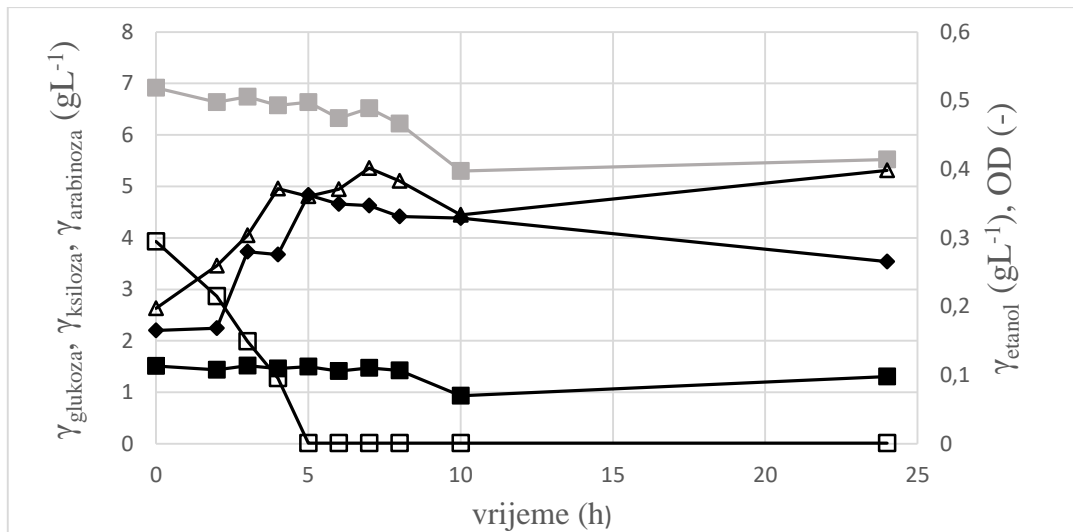
Slika 18.a. Promjena koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare) arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare) i etanola (γ_{EtOH} , \diamond) odnosno optičke gustoće (OD_{600} , \blacklozenge) na hidrolizatu pšenične slame (160 °C/ 5 min/ 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama



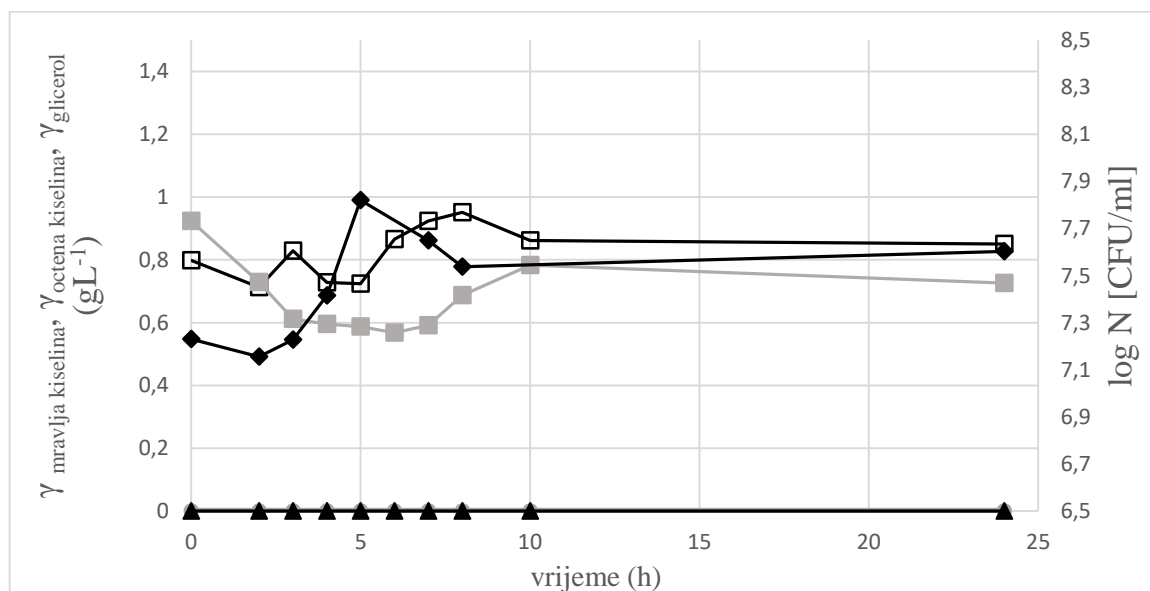
Slika 18.b. Promjena koncentracije mravlje (γ_{MK} , \square), octene (γ_{OK} , \blacksquare), levulinske (γ_{LK} , \blacksquare) kiseline, glicerola (γ_{glic} , \blacktriangle), furana (γ_{fur} , \times) i broja živih stanica ($\log N$; \blacklozenge) na hidrolizatu pšenične slame (160 °C/ 5 min/ 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvaca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama

Iz rezultata prikazanih na slici 18. vidljivo je da genetički modificirani soj kvasca Y9 ima sposobnost metaboliziranja glukoze odnosno ksiloze. Početna koncentracija glukoze odnosno ksiloze iznosila je $2,42 \text{ gL}^{-1}$ odnosno $11,60 \text{ gL}^{-1}$ dok je konačna koncentracija glukoze odnosno ksiloze iznosila $0,01 \text{ gL}^{-1}$ odnosno $7,36 \text{ gL}^{-1}$. Koncentracija arabinoze je tijekom cijelog bioprocesa bila konstantna. Potrošnju šećera potvrđuju i rezultati optičke gustoće hranjive podloge (OD_{600}) odnosno broja živih stanica ($\log N$). Vidljiv je rast genetički modificiranog kvasca, Y9 tijekom prva 3 sata uzgoja. Na početku uzgoja broj živih stanica iznosio je $1,105 \cdot 10^7 \text{ CFUmL}^{-1}$ dok je nakon 3 sata uzgoja postignut broj živih stanica od $7,55 \cdot 10^7 \text{ CFUmL}^{-1}$. Nakon 3. sata uzgoja broj živih stanica počinje padati te nakon 24 sata uzgoja iznosi $7,01 \cdot 10^6 \text{ CFUmL}^{-1}$. Smanjenje broja živih stanica kvasca može se objasniti visokom koncentracijom furana i slabih kiselina (octena, mravlja kiselina) u hidrolizatu. Koncentracija octene i mravlje kiseline su tijekom cijelog vremena trajanja uzgoja konstantne. Pad koncentracije octene odnosno mravlje kiseline u 6. odnosno 4. satu uzgoja genetički modificiranog kvasca vjerojatno su posljedica analitičkih pogrešaka. Levulinska kiselina tijekom uzgoja nije detektirana. Osim etanola detektiran je i glicerol u koncentraciji od $0,16 \text{ gL}^{-1}$. Nakon 24 sata šaržnog procesa proizvodnje bioetanola ukupno je proizvedeno $0,19 \text{ gL}^{-1}$ etanola uz efikasnost procesa od samo 1,96 % (Tablica 15.). Potrošnja supstrata odnosno prinos produkta iznosi $6,67 \text{ gL}^{-1}$ odnosno $0,07 \text{ gL}^{-1}$. Stupanj konverzije supstrata u produkt iznosi $0,01 \text{ gg}^{-1}$.

Rezultati anaerobnog uzgoja genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae* Y9 na hranjivoj podlozi s tekućim dijelom hidrolizata dobivenih predobradom pšenične slame pri temperaturi od 160 °C i vremenu zadržavanja od 10 min prikazani su na slici 19..



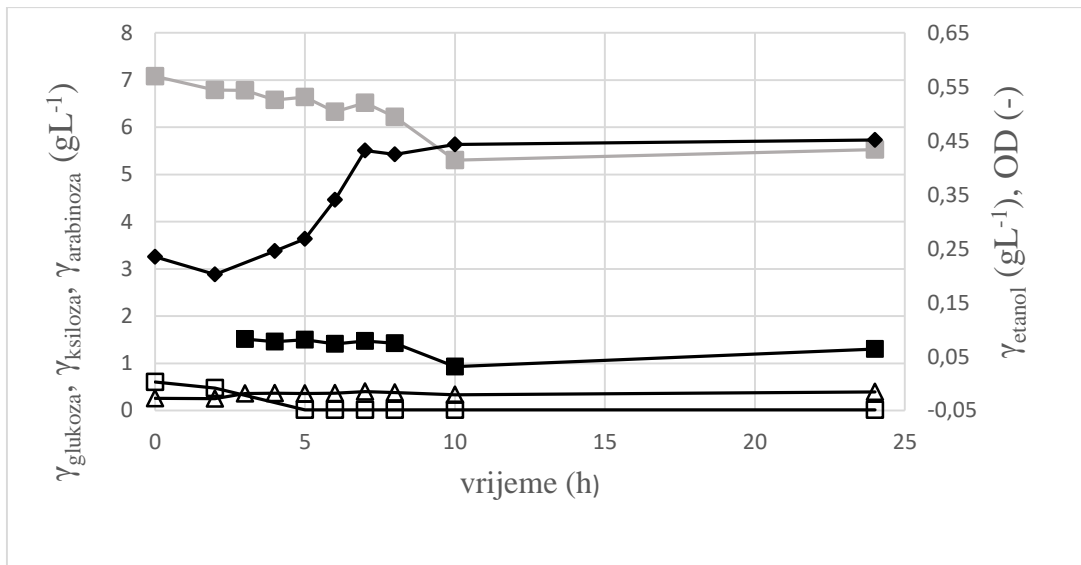
Slika 19.a. Promjena koncentracije glukoze (γ_{glc} , □), ksiloze (γ_{ksi} , ■) arabinoze (γ_{arab} , ■), i etanola (γ_{EtOH} , Δ) odnosno optičke gustoće (OD₆₀₀, ◆) na hidrolizatu pšenične slame (160 °C/ 10 min/ 2,0 % H₃PO₄) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama



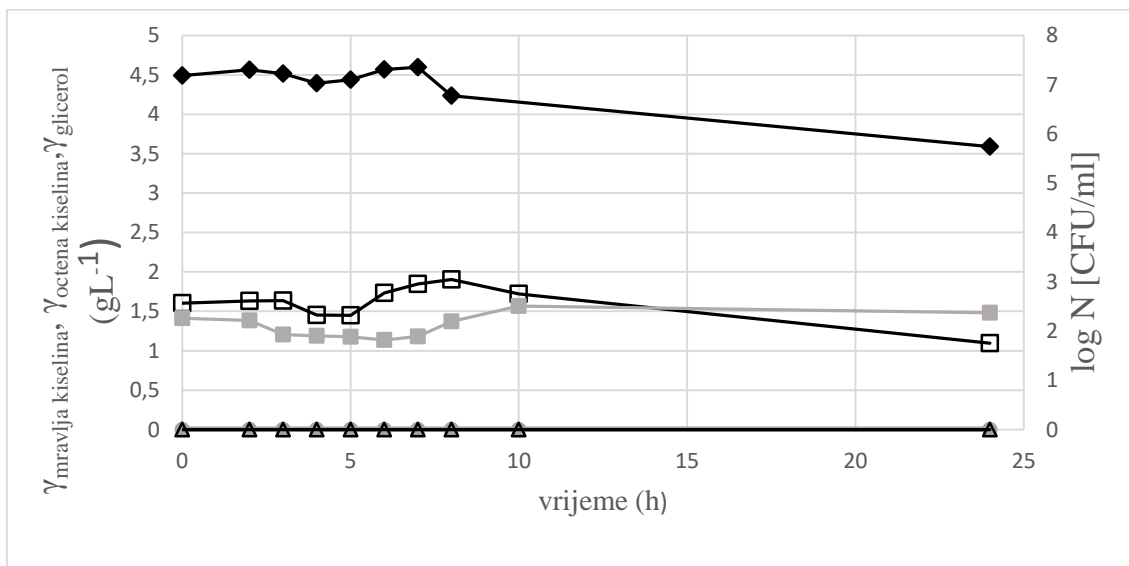
Slika 19.b. Promjena koncentracije mravlje kiseline (γ_{MK} , □), octene kiseline (γ_{OK} , ■), glicerola (γ_{glic} , ▲) i broja živih stanica (log N; ◆) na hidrolizatu pšenične slame (160 °C/ 10 min/ 2,0 % H₃PO₄) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama

U hidrolizatu dobivenim predobradom pšenične slame pri temperaturi od 160 °C i vremenu zadržavanja od 10 min ukupna koncentracija šećera iznosila je 11,08 gL⁻¹. U prvih 5 sati uzgoja zabilježena je potpuna potrošnja glukoze, nakon čega genetički modificirani soj kvasca Y9 započinje potrošnju ksiloze. Početna koncentracija glukoze iznosila je 3,93 gL⁻¹ dok je početna koncentracija ksiloze iznosila 6,92 gL⁻¹. Koncentracija ksiloze nakon 24 sata uzgoja iznosi 5,52 gL⁻¹. Koncentracija arabinoze je tijekom cijelog bioprocesa konstantna. Promjena optičke gustoće pri 600 nm (OD₆₀₀) je u skladu s promjenama broja živih stanica (log N). Tijekom prvih 5 sati uzgoja koncentracija genetički modificiranog kvasca raste. Početan broj živih stanica iznosi 7,2 *10⁷ CFUmL⁻¹, te nakon 5 sati uzgoja broj živih stanica raste do 6,60 *10⁷ CFUmL⁻¹. Nakon 24 sata uzgoja broj živih stanica pada na vrijednost od 4,0 *10⁷ CFUmL⁻¹. Smanjenje broja živih stanica posljedica je relativno visoke koncentracije toksičnih spojeva i ukupnih furana. Koncentracija mravlje odnosno octene kiseline konstanta je tijekom cijelog bioprocesa. Zabilježena odstupanja u koncentraciji mravlje odnosno octene kiseline vjerojatno su posljedica nedovoljne homogenizacije uzorka prije provođenja analize. Koncentracija mravlje kiseline kreće se u rasponu od 0,81-0,95 gL⁻¹ dok se koncentracija octene kiseline kreće u rasponu od 0,56-0,92 gL⁻¹. Koncentracija etanola na kraju bioprocesa bila je veća nego u prethodnom anaerobnom uzgoju i iznosila je 0,39 gL⁻¹. Posljedično tome efikasnost bioprocesa je veća u odnosu na uzgoj proveden na hidrolizatu dobiven predobradom pri temperaturi od 160 °C i vremenu zadržavanja od 5 min i iznosi 7,06 %. Potrošnja supstrata (ΔS) iznosi 5,51 gL⁻¹, prinos produkta iznosi 0,201 gL⁻¹ dok stupanj konverzije supstrata u produkt iznosi 0,036 gg⁻¹.

Rezultati anaerobnog uzgoja genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae* na hranjivoj podlozi s tekućim dijelom hidrolizata dobivenih predobradom pšenične slame pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 10 min prikazani su na slici 20..



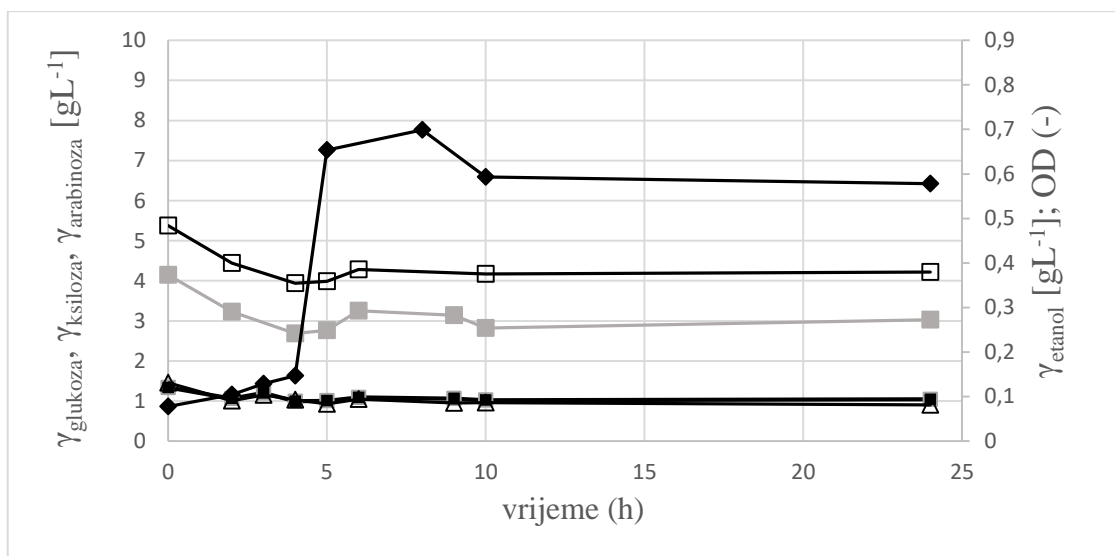
Slika 20.a. Promjena koncentracije glukoze (γ_{glc} , □), ksiloze (γ_{ksi} , ■) arabinoze (γ_{arab} , ▲) i etanola (γ_{EtOH} , Δ) odnosno optičke gustoće (OD_{600} , ◆) na hidrolizatu pšenične slame (180 °C/10 min/ 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama



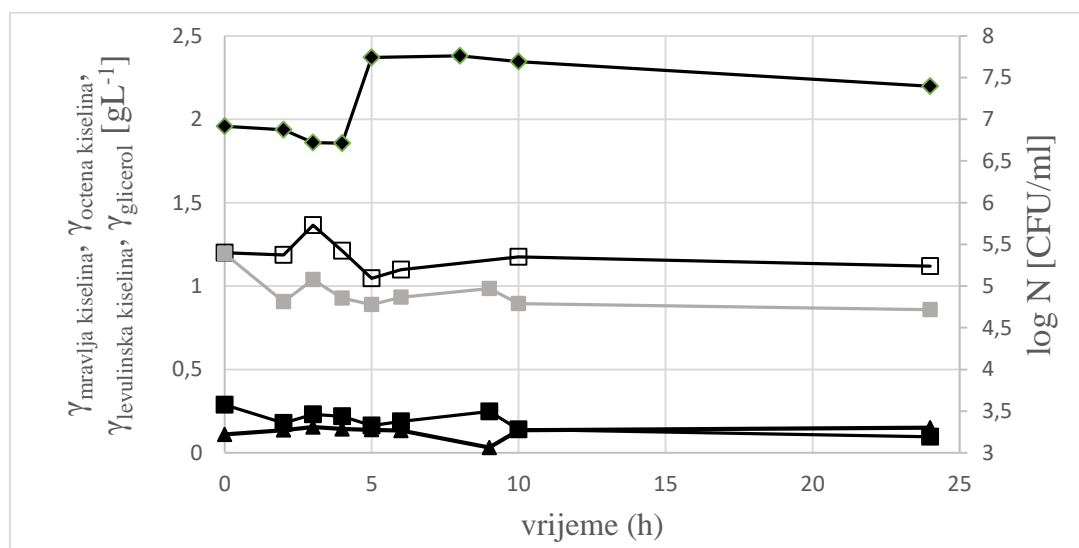
Slika 20.b. Promjena koncentracije mravlje kiseline (γ_{MK} , □), octene kiseline (γ_{OK} , ■), glicerola (γ_{glic} , Δ) i broja živih stanica ($\log N$; ◆) na hidrolizatu pšenične slame (180 °C/ 10 min/ 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama

U hidrolizatu dobivenom predobradom pšenične slame pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 10 min zabilježena je najveća koncentracija ukupnih šećera od svih hidrolizata na kojima su se provodili anaerobni uzgoji genetički modificiranog soja kvasca (13,75 gL⁻¹). U prva 4 sata anaerobnog uzgoja vidljiva je potrošnja glukoze i ksiloze pri čemu genetički modificirani soj kvasca Y9 brže troši glukozu u odnosu na ksilozu, odnosno nakon 4 sata uzgoja sva glukoza je utrošena. Početna koncentracija ksiloze iznosi 7,08 gL⁻¹ dok nakon 24 sata uzgoja koncentracija ksiloze pada na 5,52 gL⁻¹. Koncentracija arabinoze je tijekom cijelog bioprocesa konstantna, ali uočena su određena odstupanja kao posljedica analitičkih pogrešaka. I u ovom slučaju optička gustoća hranjive podloge (OD₆₀₀) pokazala se kao relativno pouzdan indikator rasta biomase kvasca te je u skladu s brojem živih stanica (log N). Prvih 7 sati uzgoja broj živih stanica raste sa 1,54 *10⁷ CFUmL⁻¹ na 2,275 *10⁷ CFUmL⁻¹. Nakon 7. sata uzgoja broj živih stanica počinje padati te na kraju uzgoja iznosi 5,52 *10⁵ CFUmL⁻¹. Koncentracije octene i mravlje kiseline tijekom cijelog vremena uzgoja su konstantne te se kreću u rasponu od 1,6 - 1,09 gL⁻¹ za mravlju kiselinu, odnosno 1,17-1,57 gL⁻¹ za octenu kiselinu. Kao i u prethodnim slučajevima levulinska kiselina nije detektirana. Zabilježena koncentracija etanola nakon 24. sata uzgoja iznosi 0,40 gL⁻¹. U odnosu na uzgoj proveden na hidrolizatu dobivenim predobradom pri temperaturi od 160 °C i vremenu zadržavanja od 10 min ostvaren je veći prinos etanola (0,14 gL⁻¹) uz veću učinkovitost procesa (11,37 %). Stupanj konverzije supstrata u produkt (Y_{P/S}) iznosi 0,058 gL⁻¹h⁻¹.

Rezultati anaerobnog uzgoja genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae*, Y9 na hranjivoj podlozi s tekućim dijelom hidrolizata dobivenih predobradom pšenične slame pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min prikazani su na slici 21..



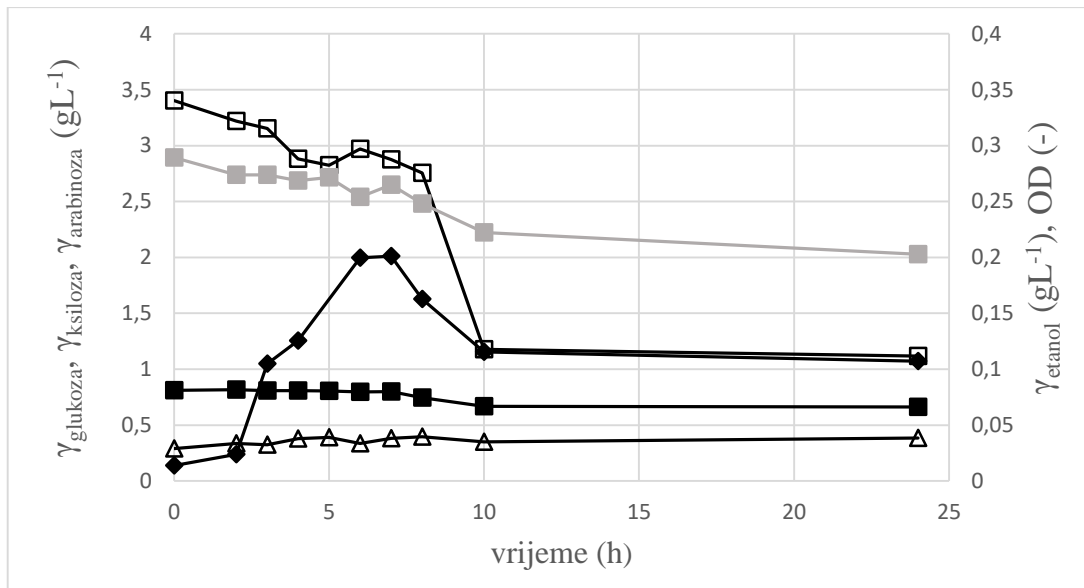
Slika 21.a. Promjena koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare) arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare) i etanola (γ_{EtOH} , Δ) odnosno optičke gustoće (OD_{600} , \blacklozenge) na hidrolizatu pšenične slame (200 °C/5 min / 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama



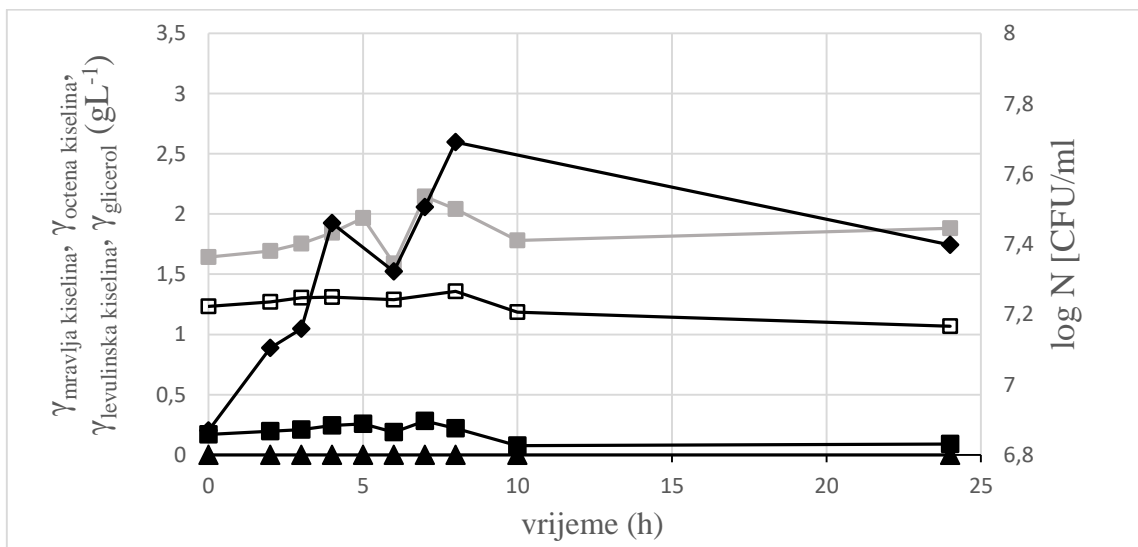
Slika 21.b. Promjena koncentracije mravlje kiseline (γ_{MK} , \square), octene kiseline (γ_{OK} , \blacksquare), levulinske kiseline (γ_{LK} , \blacksquare), glicerola (γ_{glic} , \blacktriangle) i broja živih stanica ($\log N$; \blacklozenge) na hidrolizatu pšenične slame (200 °C/ 5 min/ 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama

Ukupna koncentracija šećera u hidrolizatu dobivenom nakon predobrade pšenične slame pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min iznosila je 9,13 gL⁻¹ (Tablica 14.) od čega je koncentracija glukoze 5,55 gL⁻¹ što je najveća koncentracija glukoze kod svih postupaka predobrade pšenične slame na 200 °C. Koncentracija ksiloze je iznosila 2,96 gL⁻¹ dok je koncentracija arabinoze iznosila 0,62 gL⁻¹. Tijekom uzgoja vidljiva je potrošnja glukoze i ksiloze jednakom dinamikom. Koncentracije glukoze, odnosno ksiloze na kraju anaerobnog uzgoja iznosile su 4,22 gL⁻¹ odnosno 3,03 gL⁻¹. Potrošnja supstrata (ΔS) iznosila je 0,15 gL⁻¹. Koncentracija etanola na kraju uzgoja iznosila je svega 0,08 gL⁻¹. Osim etanola zabilježena je i sinteza glicerola. Najveća zabilježena koncentracija glicerola je iznosila 0,15 gL⁻¹. Maksimalan broj živih stanica registriran nakon 8 sata uzgoja je 5,75 *10⁷ CFUmL⁻¹ nakon čega počinje padati te u 24. satu uzgoja iznosi 2,49 *10⁷ CFUmL⁻¹. Koncentracije octene i mravlje kiseline su relativno konstantne te se nalaze u rasponu od 0,86-0,98 gL⁻¹ za octenu kiselinu odnosno 1,04 – 1,36 gL⁻¹ za mravlju kiselinu. U ovom anaerobnom uzgoju za razliku od ostalih uzgoja detektirana je i levulinska kiselina u rasponu od 0,13 – 0,28 gL⁻¹.

Rezultati anaerobnog uzgoja genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae* na hranjivoj podlozi s tekućim dijelom hidrolizata dobivenih predobradom pšenične slame pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 10 min prikazani su na slici 22..



Slika 22.a. Promjena koncentracije glukoze (γ_{glc} , \square), ksiloze (γ_{ksi} , \blacksquare) arabinoze (γ_{arab} , \blacksquare) i etanola (γ_{EtOH} , Δ) odnosno optičke gustoće (OD_{600} , \blacklozenge) na hidrolizatu pšenične slame (200 °C/ 10 min/ 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama



Slika 22.b. Promjena koncentracije mravlje kiseline (γ_{MK} , \square), octene kiseline (γ_{OK} , \blacksquare), levulinske (γ_{LK} , \blacksquare) kiseline, glicerola (γ_{glic} , \blacktriangle) i broja živih stanica ($\log N$; \blacklozenge) na hidrolizatu pšenične slame (200 °C/ 10 min/ 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyer tikvicama

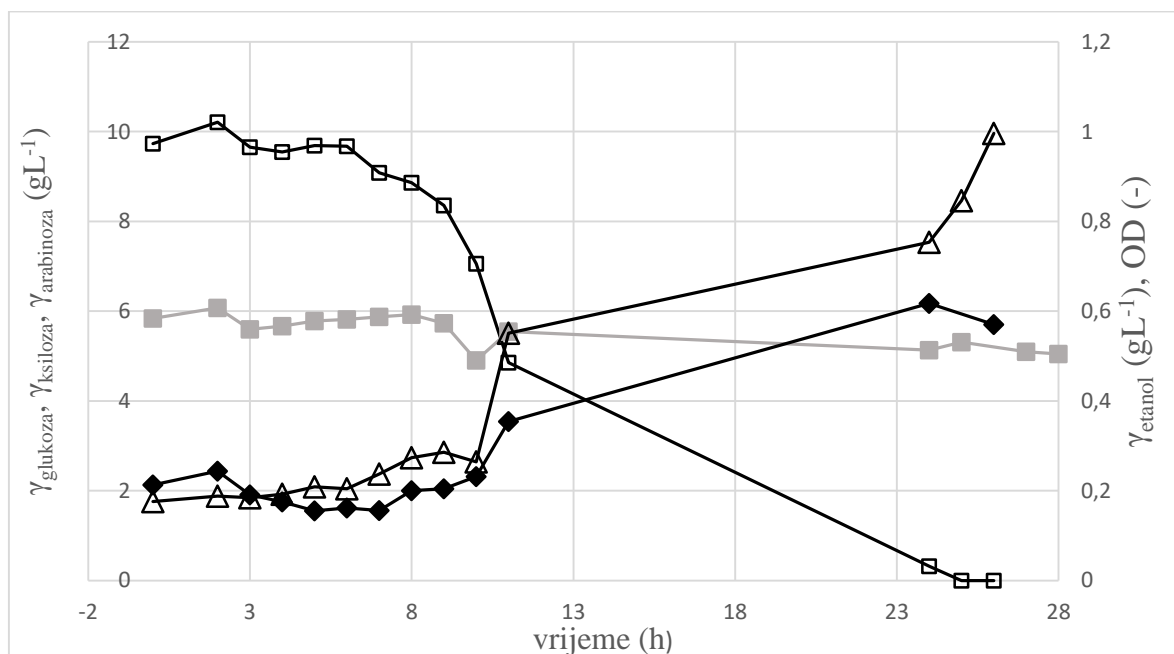
U hidrolizatu dobivenom pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 10 min zabilježena je nešto niža koncentracija ukupnih šećera (7,77 gL⁻¹) nego tijekom uzgoja na hidrolizatu pšenične slame dobivenom pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min od čega najveći udio zauzima glukoza u iznosu od 4,09 gL⁻¹. Koncentracija glukoze nakon 24. sata uzgoja iznosila je 1,12 gL⁻¹. Početna koncentracija ksiloze je iznosila 3,12 gL⁻¹ dok je koncentracija ksiloze nakon 24. sata uzgoja iznosila 2,03 gL⁻¹. Potrošnja supstrata iznosila je 3,31 gL⁻¹. Koncentracija etanola na kraju uzgoja iznosila je 0,38 gL⁻¹ što je slično anaerobnim uzgojima provedenima na hidrolizatima dobivenim pri temperaturi od 180 °C i vremenu zadržavanja od 10 min te temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 5 min. Prinos produkta (Y_P) iznosio je 0,093 gL⁻¹. Glicerol, u usporedbi sa prethodno opisanim šaržnim bioprocenom nije detektiran. Koncentracije mravlje i octene kiseline su približno konstantne tijekom cijelog bioprocasa. Levulinska kiselina je detektirana u koncentraciji od 0,07 – 0,25 gL⁻¹. Početan broj živih stanica iznosio je 7,40 *10⁶ CFUmL⁻¹ te je nakon 8 sati uzgoja postignut maksimalan prirast kvašćeve biomase u iznosu od 7,69 *10⁷ CFUmL⁻¹. Od 8. sata uzgoja zabilježen je pad rasta kvasca te na kraju uzgoja broj živih stanica iznosi 2,5 *10⁷ CFUmL⁻¹. Stupanj konverzije supstrata u produkt (Y_{P/S}) iznosio je 0,028 gg⁻¹ dok je efikasnost procesa (E) iznosila 5,49 %.

Tablica 15. Pokazatelji uspješnosti anaerobnog uzgoja divljeg soja kvasca *S. cerevisiae* i genetički modificiranog soja kvasca *S. cerevisiae* Y9 na hidrolizatima pšenične slame dobivenih kiselinskom predobradom.

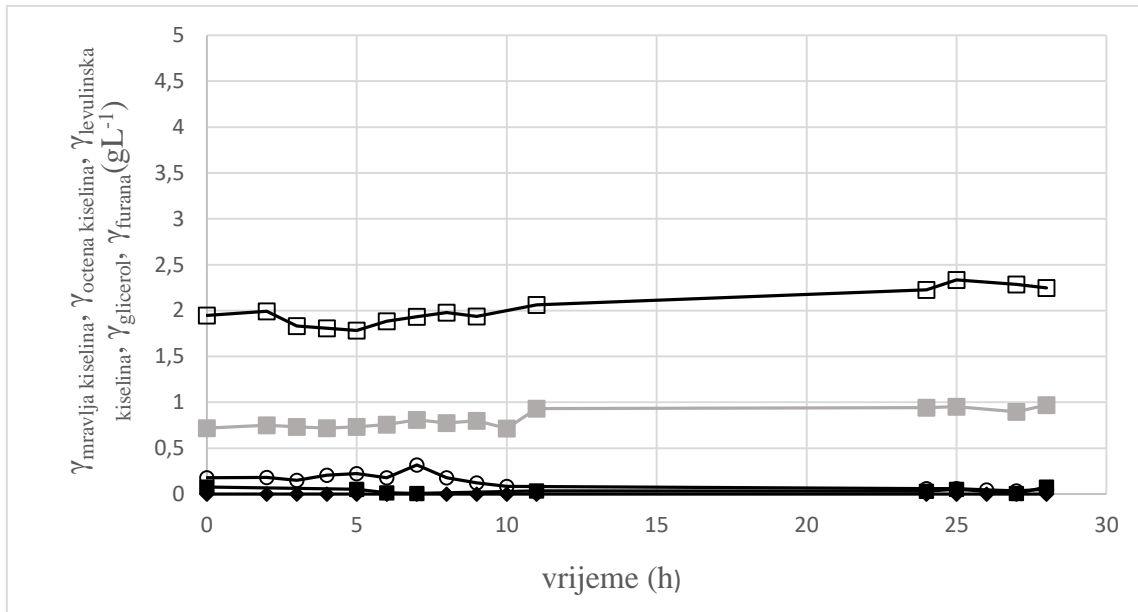
uzgoj	ΔS (gL ⁻¹)	Y _P (gL ⁻¹)	Y _{P/S} (gg ⁻¹)	Pr (gL ⁻¹ h ⁻¹)	E (%)
„divlji“ soj/ PS/180 °C/1 min/2,00 % H ₃ PO ₄	1,71	0	-	-	-
„divlji“ soj/PS/200 °C/5 min/2,00 % H ₃ PO ₄	0,15	0	-	-	-
Y9/ PS/160 °C/5 min/2,00 % H ₃ PO ₄	6,67	0,07	0,01	0,0029	1,96
Y9/ PS/200 °C/5 min/2,00 % H ₃ PO ₄	2,57	-	-	-	-
Y9/ PS/160 °C/10 min/2,00 % H ₃ PO ₄	5,51	0,20	0,036	0,0084	7,06
Y9/ PS/180 °C/10 min/2,00 % H ₃ PO ₄	2,36	0,14	0,06	0,0057	11,37
Y9/ PS/200 °C/10 min/2,00 % H ₃ PO ₄	3,31	0,09	0,028	0,0012	5,49
Y9/ kontrolna podloga/ glukoza + ksiloza	11,69	0,21	0,02	0,008	3,93
Y9/ kontrolna podloga/ ksiloza	1,28	0,06	0,05	0,03	9,8

4.3. ŠARŽNI ANAEROBNI UZGOJ GENETIČKI MODIFICIRANOG KVASCA *Saccharomyces cerevisiae* Y9 NA HIDROLIZATU PŠENIČNE SLAME U HORIZONTALNO ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM BIOREAKTORU (HRCB-u)

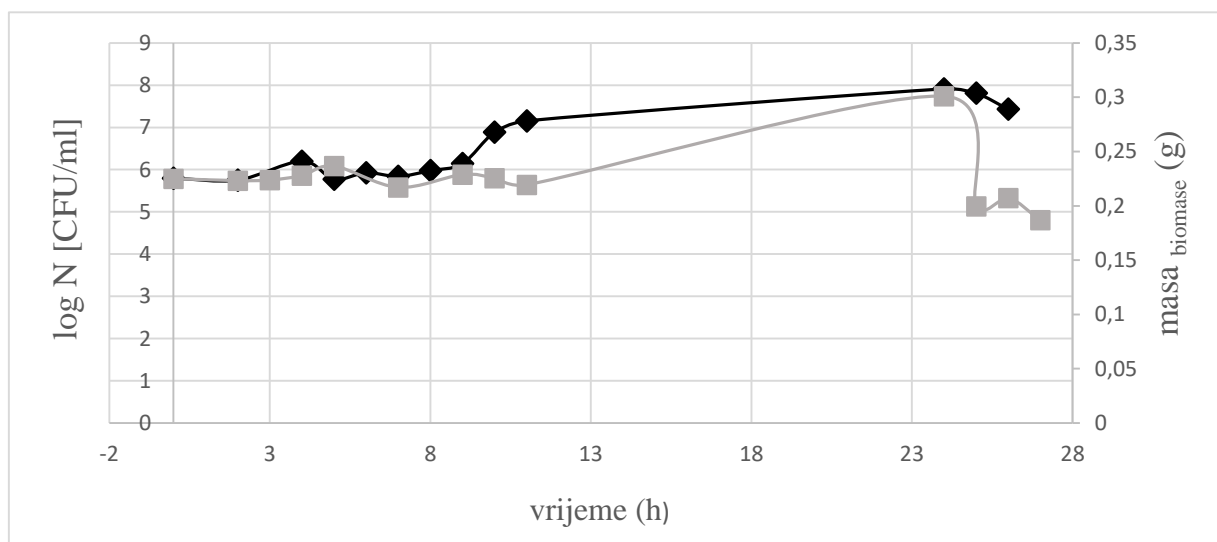
U ovom dijelu istraživanja opisan je šaržni anaerobni uzgoj genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 na hidrolizatu pšenične slame u HRCB-u. Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* Y9 proveden je HRCB-u s ciljem potvrde rezultata istraživanja u Erlenmeyer tikvicama. HRCB je konstruiran za proizvodnju etanola na polučvrstim supstratima kao što su i hidrolizati lignoceluloznih sirovina. Anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* u HRCB-u proveden je na hidrolizatu pšenične slame dobivenom postupkom predobrade pri temperaturi 180 °C i vremenu zadržavanja od 10 min s obzirom da je tijekom tog bioprocasa u Erlenmeyer tikvicama zabilježen najveći prinos produkta (0,134 gL⁻¹) odnosno efikasnost bioprocasa (11,37 %). Tijekom ovog bioprocasa praćene su promjene sastojaka hranjive podloge na isti način kao i kod anaerobnog uzgoja u Erlenmeyer tikvicama. Dodatno je određivana koncentracija mikrobne biomase gravimetrijski. Rezultati šarnog anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u HRCB-u prikazani su na slici 23..



Slika 23.a. Promjena koncentracije glukoze (γ_{glc} , □), ksiloze (γ_{ksi} , ■) arabinoze (γ_{arab} , ■) i etanola (γ_{EtOH} , Δ) odnosno optičke gustoće (OD₆₀₀, ◆) na hidrolizatu pšenične slame (180 °C/ 10 min/ 2,0 % H₃PO₄) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u HRCB-u.



Slika 23.b. Promjena koncentracije mravlje (γ_{MK} , \square), octene (γ_{OK} , \blacksquare), levulinske (γ_{LK} , \blacksquare) kiseline, glicerola (γ_{glic} , \blacktriangle) i ukupnih furana (γ_{fur} , \times) na hidrolizatu pšenične slame (180 °C/ 10 min 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u HRCB-u



Slika 24.c. Promjena broja živih stanica ($\log N$, \blacksquare) i koncentracije biomase (\blacksquare) na hidrolizatu pšenične slame (180 °C/ 10 min 2,0 % H_3PO_4) tijekom anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 u HRCB-u

Iz prikazanih rezultata (Slika 23.a.) potpuna potrošnja glukoze vidljiva je nakon 25 sati uzgoja dok je koncentracija ksiloze do 25. sata uzgoja približno konstantna. Početna koncentracija ksiloze iznosi $5,84 \text{ gL}^{-1}$ dok se koncentracija ksiloze u 26. satu uzgoja naglo smanjuje na $2,86 \text{ gL}^{-1}$. Praćenjem promjena supstrata tijekom anaerobnog uzgoja može se primjetiti diauksijalni rast genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae*. Cilj genetičkog inženjerstva je konstrukcija soja kvasca za procese proizvodnje bioetanolu gdje će se istovremeno trošiti glukoza i ksiloza u svrhu skraćivanja vremena fermentacije i povećanja produktivnosti procesa. Krajnji cilj je dobivanja ekonomski održivog industrijskog procesa proizvodnje bioetanolu pomoću genetički modificiranog mikroorganizma (Moysés i sur., 2016). Međutim, dosada ni jedan od brojnih genetički modificiranih sojeva kvasca *S. cerevisiae* nije primjenjen u industrijskoj proizvodnji etanola zbog relativno niske produktivnosti bioprocasa (Ivančić Šantek i sur., 2016). Jedan od razloga je diauksijalni rast kvasca tj. kvasac počinje trošiti ksilozu tek nakon potpune potrošnje glukoze iz hranjive podloge. Kod dijauksijalnog trošenja glukoze i ksiloze potrošnja ksiloze je inhibirana glukozom kao preferabilnim šećerom. S obzirom da transportni sustav kvasca favorizira glukozu, i u situacijama kada je metabolizam glukoze poremećen inhibitornim efekt glukoze nad metabolizmom ksiloze je i dalje vidljiv (Moysés i sur., 2016). Tijekom svih 26 sati uzgoja koncentracije toksičnih spojeva su približno konstantne. Najveća postignuta koncentracija octene, odnosno mravlje kiseline iznosila je $0,97 \text{ gL}^{-1}$, odnosno $2,29 \text{ gL}^{-1}$. Najveća koncentracija levulinske kiseline odnosno ukupnih furana je $0,07 \text{ gL}^{-1}$ odnosno $0,32 \text{ gL}^{-1}$. Detektirani toksični sastojci hranjive podloge (octena, mravlja, levulinska kiselina, furani) inhibiraju metabolizam kvasca čak i pri malim koncentracijama prolongirajući lag – fazu kvasca, oštećujući staničnu membranu što dovodi do acidifikacije citoplazme što u konačnici rezultira smanjenjem prinosa etanola i produktivnosti bioprocasa (Moysés i sur., 2016). Tolerantnost metabolizma kvasca na inhibirajuće komponente hidrolizata ne ovisi samo o vrsti kvasca nego i izvoru ugljika. Kvasci su podložniji inhibiciji tijekom fermentacije na ksilozi u odnosu na glukozu. Razlog tomu je karakteristična puno manja brzina potrošnje ksiloze u odnosu na glukozu prilikom rasta kvasca na ksilozi što može dovesti do narušavanja metabolizma kvasca i trošenja određenih bitnih kofaktora koji mogu biti osobito važni kvascu prilikom stresnih situacija (Bergdahl i sur., 2012). Rast kvašćeve biomase može se uočiti kroz promjene broja živih stanica ($\log N$). Početan broj živih stanica iznosio je $6,3 \cdot 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$. Najveći broj živih stanica postignut je u 25. satu uzgoja u iznosu od $6,49 \cdot 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$ nakon čega počinje padati i u 26. satu uzgoja iznosi $2,72 \cdot 10^7 \text{ CFU mL}^{-1}$. Promjene broja živih stanica ($\log N$) prate i promjene optičke gustoće hranjive podloge i promjene biomase kvasca (Slika

23.a. i Slika 23.b.). Pad broja živih stanica u 26. satu uzgoja može se objasniti kao posljedica nakupljanja štetnih tvari u hranjivoj podlozi koje usporavaju metaboličku aktivnosti kvasca (Pavlečić i sur., 2012). Na kraju bioprocasa proizvedeno je ukupno $0,99 \text{ gL}^{-1}$ etanola uz produktivnost bioprocasa od $0,0315 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ te učinkovitost od 12,56 %.

5.ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti slijedeće:

1. Nakon kiselinske predobrade pšenične slame u visokotlačnom reaktoru, pri temperaturama od 160 °C, 180 °C i 200 °C, vremenu zadržavanja od 1, 5, 10 min i koncentraciji fosforne kiseline od $w_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 2,0$ % dobivene su dvije faze – čvrsta (predobrađena pšenična slama) i tekuća faza. Udio glukana u tekućem dijelu predobrađene pšenične slame iznosio je od 2,84 do 5,40 %, ksilana od 2,82 do 11,14 %, arabinana od 0,58 do 2,09 % i lignina topivog u kiselini (LTK) od 0,84 do 2,18 %. Udio glukana u čvrstom dijelu hidrolizata pšenične slame iznosio je od 26,45 do 82,43 %, ksilana od 6,71 do 19,64 %, arabinana od 0,00 do 9,01 %, lignina netopivog u kiselini (LNTK) od 30,25 % do 40,85 % i lignina topivog u kiselini (LTK) od 0,24 do 2,64 %.
2. Nakon kiselinske predobrade pšenične slame pri temperaturi 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 min te različitim koncentracijama fosforne kiseline ($w_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 0,5$ %, 1,0 %, 1,5 % i 2,0 %) dobivene su dvije faze – čvrsta (predobrađena pšenična slama) i tekuća faza. Udio glukana u tekućoj fazi iznosio je od 1,47 do 2,79 %, ksilana od 4,58 do 6,64 %, arabinana od 0,48 do 1,25 % i lignina topivog u kiselini (LTK) od 0,66 do 0,97 %. Udio glukana u čvrstoj fazi iznosio je 42,63 %, ksilana 13,60 %, arabinana 2,37 %, lignina netopivog u kiselini (LNTK) 30,40 % i lignina topivog u kiselini (LTK) 0,25 %.
3. Provođenjem kiselinske hidrolize pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri temperaturi od 180 °C, vremenu zadržavanja od 5 min i različitim koncentracijama fosforne kiseline ($w_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 0,5$ %, 1,0 %, 1,5 % i 2,0 %) najveći udio glukana, odnosno ksilana dobiveni su predobrađom pri koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 % i iznosili su 2,79 % odnosno 6,64 %.
4. Provođenjem kiselinske hidrolize pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri uvjetima temperature od 200 °C, vremenu zadržavanja od 5 min i koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 % dobiven je najveći udio glukana u tekućem dijelu hidrolizata i iznosio je 5,40 %. Pri navedenim uvjetima također je postignut najveći postotak iskorištenja glukoze i iznosio je 11,17 %.

5. Provođenjem kiselinske hidrolize pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pri temperaturi 180 °C, vremenu zadržavanja od 1 min i koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 % dobiven je najveći postotak iskorištenja ukupnih ugljikohidrata koji je iznosio 23,83 %, najveći postotak iskorištenja ksilana koji je iznosio 44,24 % i najveći postotak iskorištenja arabinana koji je iznosio 48,47 %.
6. Šaržni anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* na hranjivim podlogama s hidrolizatima pšenične slame u Erlenmeyer tikvicama pokazuje da su veće vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocasa zabilježene tijekom uzgoja genetički modificiranog kvasca Y9 na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame dobivenim pri temperaturi 180 °C, vremenu zadržavanja od 10 min i koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 % u odnosu na divlji soj kvasca *S. cerevisiae*. U tom uzgoju zabilježene su ove vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocasa: $Y_{P/S} = 0,028 \text{ gg}^{-1}$, $Pr = 0,00116 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ i $E = 11,37 \%$.
7. Provjera rezultata anaerobnog uzgoja kvasca u Erlenmeyer tikvicama izvršena je u horizontalno rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB). Tijekom šaržnog anaerobnog uzgoja genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 na hranjivim podlogama s hidrolizatom pšenične slame dobivenom predobradom pšenične slame pri temperaturi 180 °C, vremenu zadržavanja od 10 min i koncentraciji fosforne kiseline od 2,0 % zabilježene su ove vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocasa: $Y_{P/S} = 0,064 \text{ gg}^{-1}$, $Pr = 0,0315 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ i $E = 12,55 \%$

6. POPIS LITERATURE

Allen, S.A., Clark, W., McCaffery, J.M., Cai, Z., Lanctot, A., Slininger, P.J., Liu, Z.L., Gorsich, S.W. (2010) Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomcey cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. **3:2**, 1-14.

Anwar, Z., Gulfraz, M., Irshad, M. (2014) Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *J Radiat Res*. **2014**, 163-173.

Ask, M., Bettiga, M., Mapelli, V., Olsson, L. (2013) The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. **6(1):22**, 1-15.

Atwell, W.A. (2001). An overview of wheat development, cultivation, and production.

Azhar, S.H.M., Abdulla, R., Jambo, S.A., Marbawi, H., Gansau, J.A., Faik, A.A.M., Rodrigues, K.F. (2017) Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. **10**, 52-61.

Balat, M., Balat, H. (2009) Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. **34**, 551-573.

Balat, M., Balat, H. (2009) Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Appl. Energ.* **86**, 2273-2282.

Boe, A., Jeranyama P., Lee, D.K., Owens, V.N. (2010) Composition of Herbaceous Biomass Feedstocks, South Dakota State University, SAD.

Cereal Food World. **46 (2)**, 59–62.

Chandel, A.K., Felipe, A.F., Vaz de Arruda, P.A., Milessi, T.S.S., da Silvia, S.S., Gracas, M. (2012) Dilute Acid Hydrolysis of Agro-Residues for the Depolymerization of Hemicellulose: State of Art: U: D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization, (da Silva, S.S., Chandel, A.K., ured.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str. 39-61.

Chinga-Carrasco, G. (2011) Cellulose fibres, nanofibrils and microfibrils: the morphological sequence of MFC components from a plant physiology and fibre technology point of view. *Nanoscale research letters*, **6(1)**, 417.

Danon, F., van der Aa, L., de Jang., W. (2013) Furfural degradation in a dilute acidic and saline solution in the presence of glucose. *Carbohydr. Res.* **375**, 145-152.

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

Govedarica, D. (2016) Predobrada kukuruznih oklasaka za proizvodnju bioetanol. Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb, završni rad.

Gunnarsson, S., Marstorp, H., Dahlin, A.S., Witter, E. (2008) Influence of non-cellulose structural carbohydrate composition on plant material decomposition in soil. *Biology and Fertility of Soils.* **45**, 27-36.

Hassan, M.H., Kalam, M.A. (2013) An Overview of Biofuel as Renewable Energy Source: Development and Challenges. *Procedia Engineer.* **56**, 39-53.

Helle, S., Cameron, D., Lam, J., White, B., Duff, S. (2003) Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S.Cerevisie*. *Enzyme Microb Tech.* **33**, 786-792.

Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.* **100(1)**, 10-18.

Hu, R., Lin, L., Liu, T., Liu, S. (2010) Dilute sulfuric acid hydrolysis of sugar maple wood extract at atmospheric pressure. *Bioresource Tehnol.* **101**, 3586-3594.

Iqbal, H.M.N., Kyazze, G., Keshavarz, T. (2011) Advances in the Valorization of Lignocellulosic Material by Biotechnology: An Overview. *Bioresources.* **8(2)**, 3157-3176.

Ivančić – Šantek, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek, B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kem – Ind.* **65**, 25-38.

Ivančić, F. (2016) Predobrada pšenične slame za proizvodnju bioetanol. Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb, završni rad.

Jiang, J., Tang, Y., Dou, X., Lei, F., Liu, Z. (2016) Yield-determining components in high-solid integrated first and second generation bioethanol production from cassava residues, furfural residues and corn. *RSC Advances.* **56**, 1-15.

Jönsson, L.J., Alriksson, B., Nilvebrant, N-O. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels.* **6:16**, 1-10.

- Jönsson, M., Martin, C. (2016) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by – products and strategies for minimizing effects. *Bioresource Tehnol.* **199**, 103-112.
- Kang, Q., Appels, L., Tan, T., Dewil, R. (2014) Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Current Findings Deterime Research Priorities. *Sci World J.* **14**, 1-13.
- Ko, J.K., Um, Y., Park, Y-C., Seo, J-H., Kim, K.H. (2015) Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose. *Appl Microbiol Biotechnology.* **99**, 4201-4212.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., Stroeve, P. (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **5**, 1-18.
- Kumari, R., Pramanik, K. (2013) Bioethanol Production from Ipomoea Carnea Biomass Using a Potential Hybrid Yeast Strain. *Appl Biochem Biotech.* **171**, 771-785.
- Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrandt, N-O., Jönsson, L.J. (2000) Influence of lignocellulose –derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisie*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **34**, 617-632.
- Lauder, A. (2016) Predobrada kukuruzovine za proizvodnju bioetanola. Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb, završni rad.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E. (2005) Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. In Twenty-sixth symposium. *Biotechnology for fuels and chemicals* (pp. 1081-1099). Humana Press.
- Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill, E., Ahmad, M.N.M., Rooney, D.W., Walker, G.M. (2010) Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chem Eng J.* **156**. 395-403.
- Limayem, A., Rickie, S.C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science.* **38**, 449-467.
- Malherbe, S., Cloete, T.E. (2002) Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Environ Sci Technol.* **1**, 105-114.

- Martinez, A., Rodriguez, M.E., York, S.W., Preston, J.F., Ingram, L.O. (2000) Use of UV Absorbance To Monitor Furans in Dilute Acid Hydrolysates of Biomass. *Biotechnol. Prag.* **16**, 637-641.
- Mills, A., Ecklund, E.E. (2007) Alcohols as components of transportation fuels. *Annual Review of Energy.* **12**, 48-80.
- Modig, T., Liden, G., Taherzadeh, M.J. (2002) Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem J.* **1:363**, 769-776.
- Mušak, L. (2016) Proizvodnja etanola na hidrolizatima lignocelululoznih sirovina pomoću kvasca *Saccharomcces cerevisiae* u horizontalno rotirajućem cijevnom bioreaktoru. Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb, diplomski rad.
- Mutwill, M., Debolt, S., Persson, S. (2008) Cellulose synthesis: a complex. *Curr. opin. plant biol.* **11(3)**, 252-257.
- Naik., S.N., Goud, V.V., Rout, P.K., Dalai, A.K. (2010) Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew Sust Energ Rev.* **14**, 578-597.
- Nigam, P.S., Singh, A. (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Pro. Energ. Comb.Sci.* **37**, 52-68.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolyates. II: inhibitors and mehanisms of inhibition. *Bioresourc Tehnol.* **74**, 25-33.
- Pavlečić, M., Lulić, V., Gašpari S., Ivančić – Šantek, M., Horvat, P., Šantek, B. (2012) Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanola na svježem soku od šećerne repe. *Croatian Journal of Food Technology, Botehnology.* **(1-2)**, 112-117.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J. (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol.* **5**, 53-63.
- Prasad, S., Singh, A., Joshia, H.C. (2007) Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour Conserv Recycli.* **50**, 1–39.
- Rezić, T., Ivančić – Šantek, M., Andlar, M., Pavlečić, M., Šantek B. (2016) Comparision od different techniques for bioethanol production from lignocellulosic raw material. *Croatian Journal of Food Technology, Biotehnology.* **11**, 6-17.

- Sánchez, Ó.J., Cordona, C.A. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Tehnol.* **99**, 5270-5295.
- Satimanont, S., Luengnaruemitchai, A., Wongkasemjit, S. (2012) Effect of Temperature and Time of Dilute Acid Pretreatment of Corn Cobs. *International Journal of Chemical and Biological Engineering.* **6**, 333-337.
- Sluiter, J.B., Ruiz, R.O., Scarlata, C.J., Sluiter, A.D., Templeton, D.W. (2010) Composition Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *J. Agric. Food. Chem.*, **58** (16), 9403-9053.
- Somerville, C. (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **22**, 53-78.
- Taherzadeh M.J., Karimi, K. (2007) Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials, a review. *BioResources.* **2**, 472-499.
- Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2010) Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment hydrolysis and fermentation. *Bioresource Tehnol.* **101**, 4744-4753.
- Tesfaw, A., Assefa, F. (2014) Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture and Immobilization. *Hindawi Publishing Corporation.* **14**, 1-11.
- Thomsen, M.H., Thygesen, A., Thomsen, A.B. (2008) Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis. *Bioresource Tehnol.* **99**, 4221-4228.
- Ulbrich, R.J., Shanon, J., Thomas, J. (1984) A review of 5-hydroxymethylfurfural HMF in parental solutions. *Fung Appl Toxicol.* **4**, 843-583.
- Wadskog, I., Adler, L. (2003) Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. In *Yeast stress response*. Edited by Hohmann S., Menager WH. Berlin: Springer-Verlag; 2003: 201-240.
- Wilkie, A.C., Riedesel, K., Owens, J.M. (2000) Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass. Bioenerg.* **19**, 63-102.

Zavargo, Z.Z., Dodić, S.N., Popov, S.D., Dodić, J.M., Ranković, J.A. (2009) Potential contribution of bioethanol fuel to the transport sector of Vojvodina. *Renew Sust Energy Rev.* **13**, 2197-2200.

Henke, J.M., Klepper, G., Schmitz, N. (2005) Tax exemption for biofuels in Germany: is bioethanol really an option for climate policy?. *Energy.* **30**, 2617–2635.

Menon, V., Rao, M. (2012) Trends In bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog.Energ.Combust.* **38**, 522-550.

Asgher, M., Ahmad, Z., Iqbal, H. M. N. (2013). Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. *Industrial Crops and Products*, **44**, 488 – 495.

Rinaldi, R., Schüth, F. (2009) Acid Hydrolysis of Cellulose as the Entry Point into Biorefinery Schemes. *Chem.Sus.Chem.* **2**. 1096-1107.

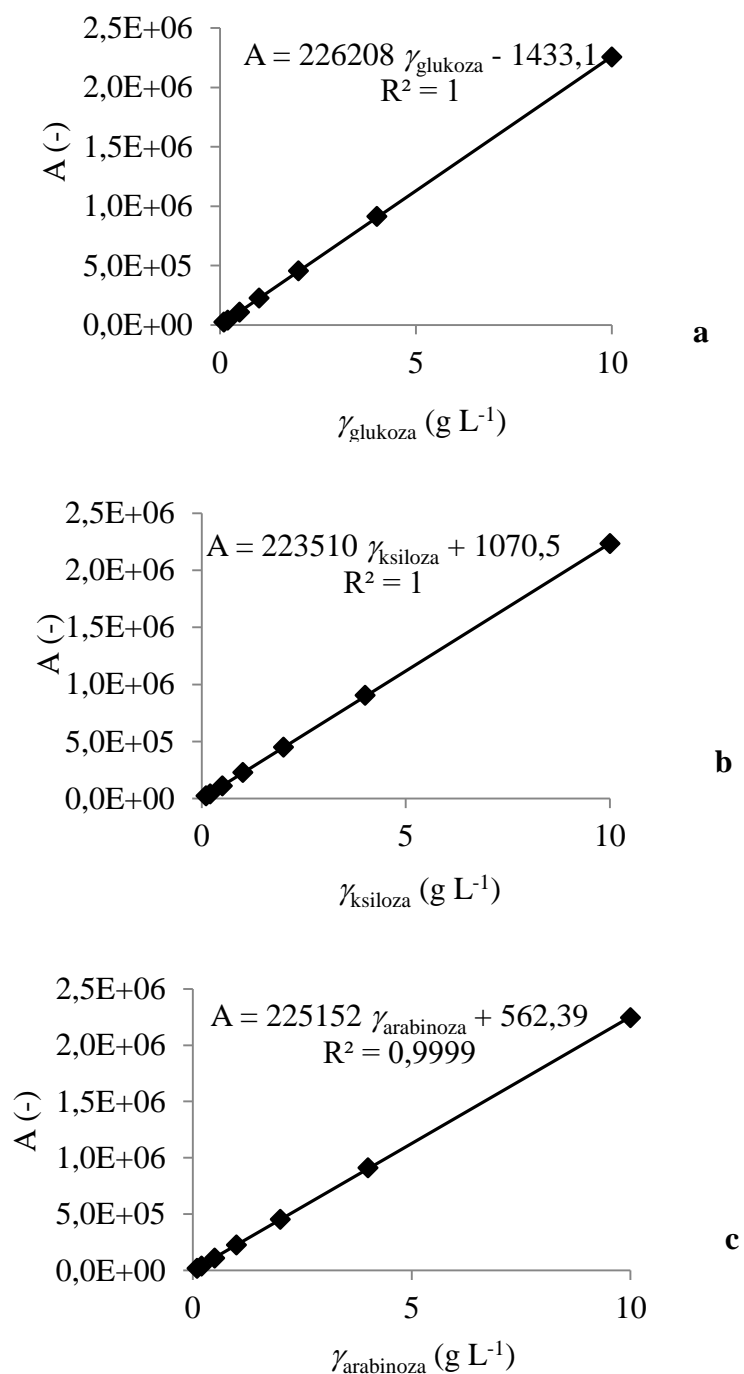
Casey, E., Sedlak, M., Ho, N.W.Y., Mosier, N.S. (2010) Effect of acetic acid and Ph on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research.* **10**, 385-393.

Bergdahl, B., Sandström, A-G-, Borgström, C., Boonyawan, T., van Niel, E.W.J. (2012) Engineering yeast hexokinase 2 for improved tolerance toward xylose-induced inactivation. *Gorwa-Grauslund MF.* **2**, 1-15.

Sanchez, B., Bautista, J. (1988) Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. *Enzyme and Microbial Technology*, **10 (5)**, 315–318.

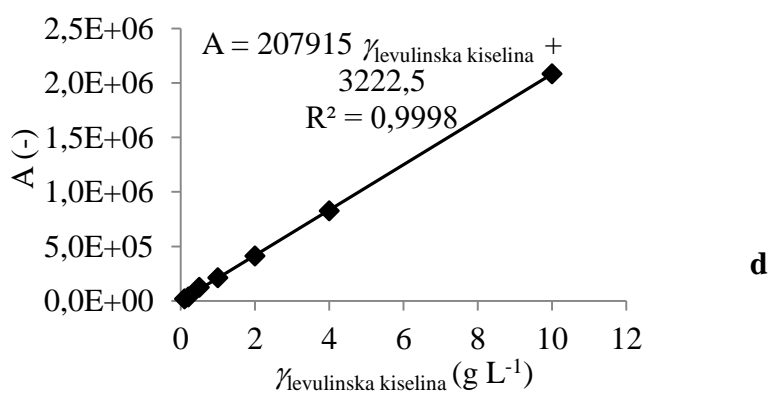
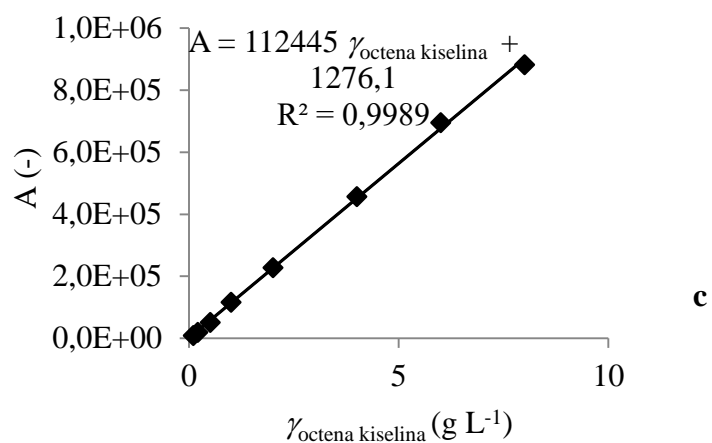
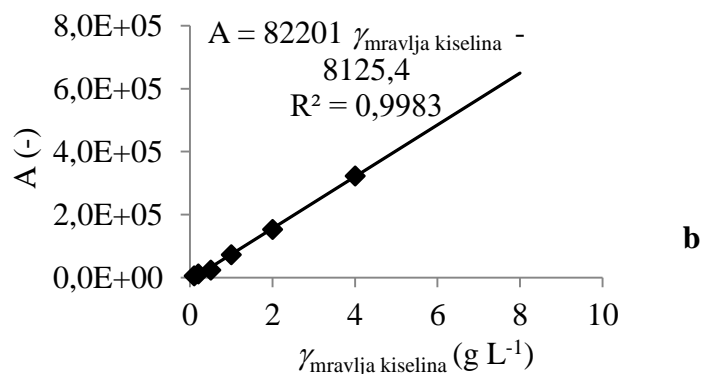
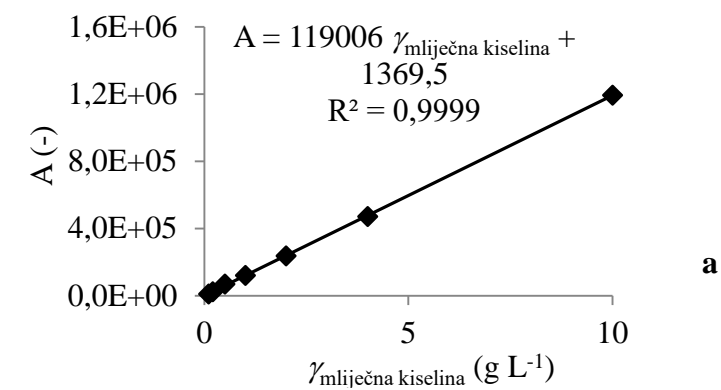
7. PRILOZI

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

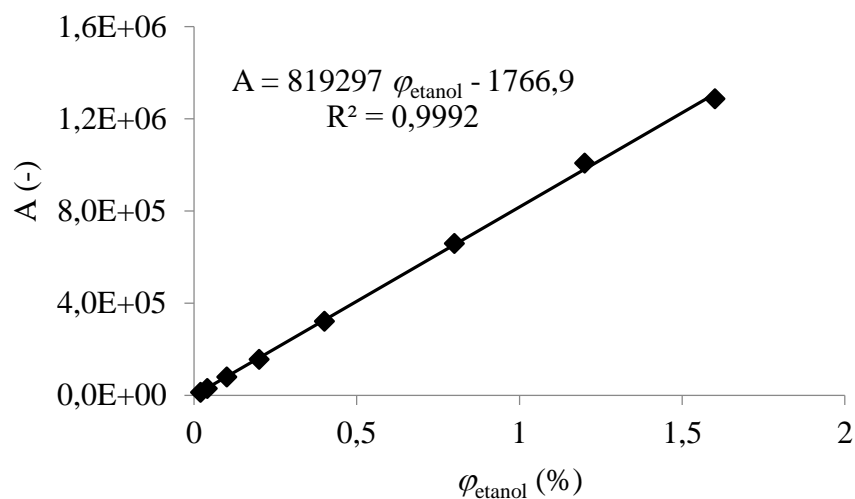


Slika 24. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije glukoze (a), ksiloze (b)

i arabinoze (c)

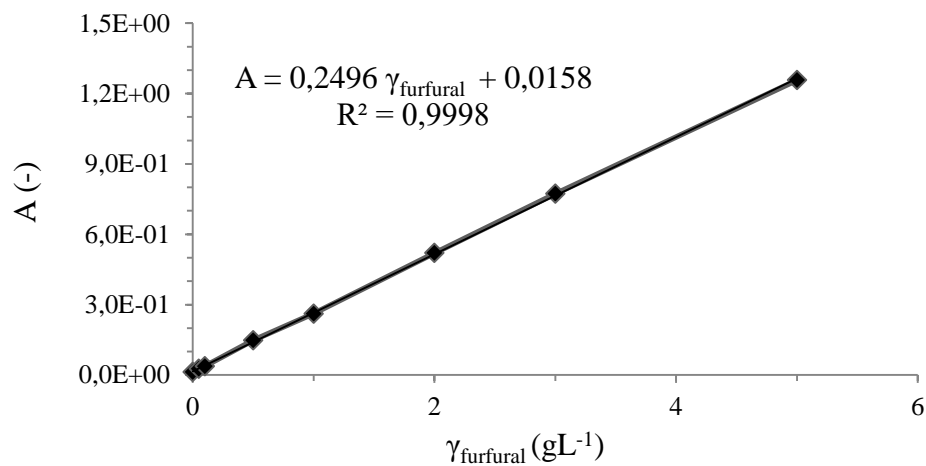


Slika 25. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije mliječne (a), mravlje (b), octene (c) i levulinske (d) kiseline.



Slika 26. Baždarni dijagram za određivanje volumnog udjela etanola.

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



Slika 27. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ukupnih furana.