

Proizvodnja etanola na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru

Mušak, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:640135>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Lucija Mušak

678/BPI

**PROIZVODNJA ETANOLA NA
HIDROLIZATIMA
LIGNOCELULOZNIH SIROVINA
POMOĆU KVASCA *Saccharomyces
cerevisiae* U HORIZONTALNOM
ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM
BIOREAKTORU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Božidara Šanteka, red.prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć višeg asistenta Marija Novaka, dr.sc.

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

ZAHVALA

Zahvaljujem svome mentoru prof. dr. sc. Božidaru Šanteku koji je svojim znanstvenim i stručnim savjetima oblikovao ideju i pomogao mi u izradi ovoga diplomskog rada.

Srdačno zahvaljujem višem asistentu, dr.sc. Mariju Novaku na susretljivost i pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela ovog rada.

Najveće hvala mojim roditeljima na potpori tijekom obrazovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

PROIZVODNJA ETANOLA NA HIDROLIZATIMA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA POMOĆU KVASCA
Saccharomyces cerevisiae U HORIZONTALNOM ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM BIOREAKTORU

Lucija Mušak, 678/BPI

Sažetak: Proizvodnja biogoriva iz obnovljivih izvora postaje moguća alternativa fosilnim gorivima. Lignoceluloza je najzastupljeniji organski materijal na zemlji i jeftina obnovljiva sirovina za proizvodnju biogoriva. Međutim, zbog složene strukture, lignocelulozna biomasa mora biti podvrgnuta predobradi, te hidrolizi polisaharida na monosaharide koje mikroorganizmi mogu konvertirati u svom metabolizmu.

U ovom istraživanju provedena je proizvodnja etanola na hidrolizatima lignocelulozних sirovina (pšenična slama, kukuruzovina, kukuruzni oklasci) pomoću kvasca *S. cerevisiae* u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru. Ispitivano je i inhibitorno djelovanje furfurala na rast kvasca i proizvodnju etanola, te je utvrđeno da koncentracija do $0,5 \text{ gL}^{-1}$ značajno ne utječe na anaerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae*. Najveća uspješnost proizvodnje etanola zabilježena je kod hranjive podloge s hidrolizatom pšenične slame pri čemu su dobiveni ovi pokazatelji uspješnosti: $Pr = 0,0678 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$; $Y_{p/s} = 0,216 \text{ gg}^{-1}$ i $E = 42 \%$.

Ključne riječi: lignocelulozna biomasa, predobrada, inhibitori, *S. cerevisiae*, bioetanol

Rad sadrži: 70 stranica, 46 slika, 8 tablica, 36 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr.sc., Božidar Šantek

Pomoć pri izradi: Mario Novak, dr.sc.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Tonči Rezić
2. Prof.dr.sc. Božidar Šantek
3. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
4. Izv.prof.dr.sc. Anita Slavica (zamjena)

Datum obrane: dan, rujna, 2016

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Brewing

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

PRODUCTION OF ETHANOL ON LIGNOCELLULOSIC RAW HYDROLYZATE BY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN A HORIZONTAL ROTATING TUBULAR BIOREACTOR

Lucija Mušak, 678/BPI

Abstract: Production of biofuels from renewable resources is becoming promising alternative to fossil fuels. Lignocellulose is the most abundant organic material on earth and cheap renewable resource for biofuel production. However, due to complex structure, lignocellulosic biomass has to be subjected to pretreatment and hydrolysis of polysaccharides to monosaccharides, which can be assimilated by microorganisms. This research was conducted ethanol production on hydrolysates of lignocellulosic raw materials (wheat straw, corn stalks, corn maize cobs) using the yeast *S. cerevisiae* in a horizontal rotating tubular bioreactor. It is examined the inhibitory effects of furfural on the growth of yeast and production of ethanol, and it was established that the concentration of up to 0.5 gL⁻¹ does not significantly affect the anaerobic cultivation of the yeast *S.cerevisiae*. Best-ethanol production was observed in culture media with the hydrolyzate of wheat straw were obtained with these performance indicators: Pr = 0.0678 gL⁻¹h⁻¹; Yp/s = 0.216 gg⁻¹, and E = 42%.

Keywords: lignocellulosic biomass, pretreatment, inhibitors, *S. cerevisiae*, bioethanol

Thesis contains: 70 pages, 46 figures, 8 tables, 36 references, 1 supplement

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: *Mario Novak, PhD.*

Reviewers:

1. PhD. *Tonči Rezić*, Associate professor
2. PhD. *Božirad Šantek*, Full professor
3. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor
4. PhD. *Anita Slavica*, Associate professor

Thesis defended: day, september, 2016

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE	3
2.1.1. Općenito o lignoceluloznim materijalima	3
2.1.2. Celuloza	4
2.1.3. Hemiceluloza	5
2.1.4. Lignin	6
2.2. PREDOBRAĐA LIGNOCELULOZNE SIROVINE	7
2.2.1. Metode predobrade.....	7
2.2.2. Fizikalno-kemijska predobrada- eksplozija vodenom parom.....	9
2.2.3. Kemijska predobrada- hidroliza kiselinom.....	10
2.2.3.1. Hidroliza razrijeđenom kiselinom	10
2.3. INHIBITORI PRISUTNI ILI DOBIVENI HIDROLIZOM LIGNOCELULOZNIH SIROVINA	11
2.3.1. Podjela inhibitora	11
2.4. RADNI MIKROORGANIZMI	14
2.4.1. Kvasci	14
2.4.2. Bakterije	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Sirovine.....	16
3.1.2. Hranjive podloge.....	16
3.1.2.1. Hranjiva podloga za uzgoj kvasca za definiranje inhibitornog učinka furfurala.....	17
3.1.2.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca u Erlenmeyer tikvicama	17
3.1.3. Mikroorganizam.....	18
3.1.4. Ostale kemikalije.....	18
3.1.5. Aparature i uređaji	18
3.1.5.1. Tresilica	18
3.1.5.2. Spektrofotometar	18
3.1.5.3. Centrifuga	19
3.1.5.4. Vage	19
3.1.5.5. Sušionik.....	19
3.1.5.6. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)	19
3.1.5.7. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)	20
3.1.5.8. Autoklav	21
3.1.5.9. Ostala oprema.....	21

3.2. METODE	22
3.2.1. Određivanje inhibitorynog djelovanja furfurala	22
3.2.1.1. Priprema podloge	22
3.2.1.2. Nadzor procesa alkoholnog vrenja.....	22
1. Određivanje optičke gustoće hranjive podloge	22
2. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase kvasca	23
3. Priprema uzoraka za HPLC -analizu	23
3.2.2. Uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u tikvicama.....	23
3.2.2.1. Određivanje ukupnog broja stanica kvasca	24
3.2.2.2. Priprema uzorka za HPLC-analizu.....	24
3.2.3. Uzgoj kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB)	25
3.2.4. Određivanje pokazatelja uspješnosti bioprocasa.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. ISPITIVANJE INHIBITORYNOG DJELOVANJA FURFURALA NA KVASAC SACCHAROMYCES CEREVISIAE	29
4.2. ANAEROBNI UZGOJ KVASCA S.CEREVISIAE NA HIDROLIZATIMA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA U ERLLENMEYER TIKVICAMA	41
4.3. ANEROBNI UZGOJ KVASCA S.CEREVISIAE NA HIDROLIZATIMA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA U HORIZONTALNOM ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM BIOREAKTORU	52
4.3.1. Anaerobni uzgoj kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatima pšenične slame ..	52
4.3.2. Anaerobni uzgoj kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruzovine	54
4.3.3. Anaerobni uzgoj kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruznih oklasaka.....	57
5. ZAKLJUČCI	61
6. LITERATURA	62
7. PRILOG 1	66

1. UVOD

Lignocelulozne sirovine kao nusprodukti šumarske i poljoprivredne proizvodnje, odnosno prerade njihovih proizvoda, te drvne i prehrambene industrije (piljevina, ostaci drva i kukuruzni, pšenični, repini ostaci te ostaci sijena ili slame) sve se više upotrebljavaju u biotehnološkim procesima kao supstrati u proizvodnji različitih proizvoda, ponajprije raznih biogoriva (Sun i Cheng, 2002.). Zbog niske cijene i obnovljivosti kontinuirano se istražuju mogućnosti primjene u proizvodnji različitih biotehnoloških proizvoda.

Lignocelulozne sirovine sastoje se od lignina, hemiceluloze i celuloze, a njihov udio ovisi o vrsti sirovine (Hamelinck i sur., 2005.). Zbog svoje kompleksne strukture i promjenjivog sastava, lignocelulozne sirovine spadaju u vrlo zahtjevne supstrate za pripremu. Stoga se prije samog biotehnološkog procesa podliježu postupku predobrade koji značajno poskupljuje proces proizvodnje. Svrha predobrade je uklanjanje lignina i prevođenje kristalične celuloze u amorfni oblik pogodan za enzimsku hidrolizu te uklanjanje dijela hemiceluloze. Metode predobrade dijele se na fizikalne, kemijske i biološke, odnosno njihove kombinacije (Yang i Wyman, 2008). Predobrada može biti najskuplji dio proces u cjelokupnom procesu konverzije biomase u goriva, ali ima veliki potencijal za poboljšanje učinkovitosti i smanjenje troškova kroz dodatno istraživanje i razvoj (Kumar i sur., 2009.). Uz cijenu predobrade, druga najveća prepreka s kojom se treba suočiti u komercijalnoj proizvodnji bioetanol iz lignoceluloznih sirovina su spojevi koji inhibiraju radni mikroorganizam, a nastaju tijekom procesa predobrade. Nastali spojevi su toksični za mikroorganizme koji provode fermentaciju. Prinos etanola i produktivnost tijekom fermentacije lignoceluloznih hidrolizata su stoga smanjeni (Parawira i Tekere, 2010.).

Nadalje, problem prijenosa biokonverzije lignocelulozne sirovine u veliko mjerilo također se treba riješiti prije industrijske primjene lignoceluloznih sirovina u proizvodnji biogoriva. Međutim, odlučujući faktor je uglavnom dostatnost podataka za učinkovito povećanja mjerila (Lonsane i sur., 1992.).

U ovom istraživanju ispitivan je utjecaj toksičnosti furfurala na rast divljeg soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i proizvodnju etanola u anaerobnim uvjetima s obzirom da je furfural jedan od toksičnih produkata kiselinske predobrade lignoceluloznih sirovina. Nadalje, proučavao se rast kvasca na lignoceluloznim hidrolizatima u laboratorijskom mjerilu pri anaerobnim uvjetima. Kao lignocelulozne sirovine korišteni su hidrolizati kukuruznih oklasaka, kukuruzovine i slame. Predobrada je uključivala tretman na temperaturi od 210 °C i

tlaku od 20 bara uz dodatak razrijeđene 1 %- tne sulfatne kiseline i vrijeme zadržavanja od 5 minuta.

Kako je dokazano da u dobivenim hidrolizatima odabrani soj kvasca raste i proizvodi etanol, napravio se drugi set eksperimenta u većem mjerilu. Kao bioreaktorski sustav se koristio horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB) vlastite izvedbe.

Rezultati istraživanja su pokazali da divlji soj kvasca *S.cerevisiae* može provoditi proces alkoholnog vrenja na dobivenim hidrolizatima lignoceluloznih sirovina. Stoga su dobiveni hidrolizati lignoceluloznih sirovina korišteni za proizvodnju etanola u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору (HRCB). Na osnovi rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da je neophodno provesti dodatna istraživanja s ciljem optimiranja bioprocasa i sastava hranjive podloge za proizvodnju etanola.

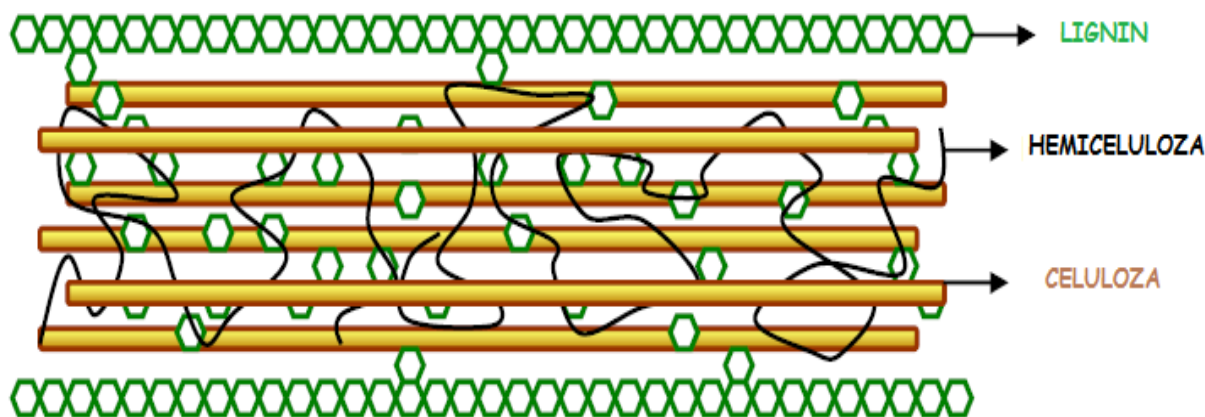
2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

2.1.1. Općenito o lignoceluloznim materijalima

Lignoceluloznu biomasu, koju čine šumarski, poljoprivredni i agro-industrijski otpad, obnovljiv je i jeftin izvor energije kojeg ima u neograničenim količinama. Taj otpad uključuje različite materijale kao što su piljevina, bagasa šećerne trske, otpadni papir, pivski trop, trave, lišće, ljuske žitarica kao što su riža, pšenica, kukuruz, sirak i ječam (Mussatto i Teixeira, 2010.). Lignocelulozni otpad akumulira se svake godine u velikim količinama, uzrokujući probleme u okolišu. Međutim, zbog njihova kemijskog sastava, prvenstveno šećera, može se koristiti za proizvodnju vrijednih proizvoda poput etanola, vitamina, organskih kiselina, otapala, enzima i biopolimera (Mussatto i Teixeira, 2010.).

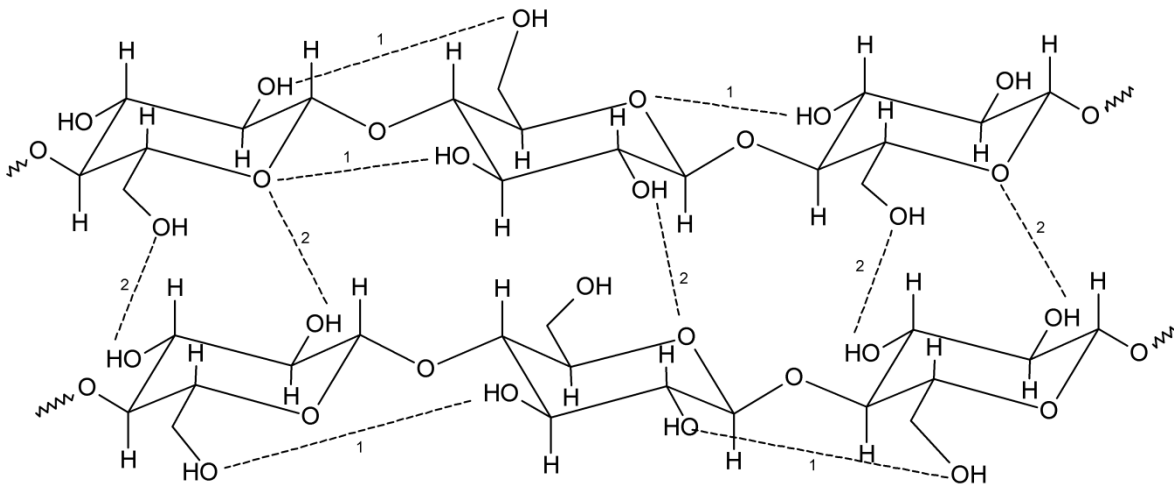
Lignocelulozna sirovina sastoji se od celuloze (40-50%), hemiceluloze (25-30%) i lignina (15-20%). Sastav ovih biopolimera varira ovisno o vrsti biljke. Nadalje, sastav jedne biljke mijenja se sa dobi, stadijom rasta, genetičkim faktorima, te uvjetima rasta biljke i klimatsko-geografskim čimbenicima (Perez i sur., 2002.).



Slika 1. Struktura lignocelulozne sirovine (Mussatto i Teixeira, 2010.)

2.1.2. Celuloza

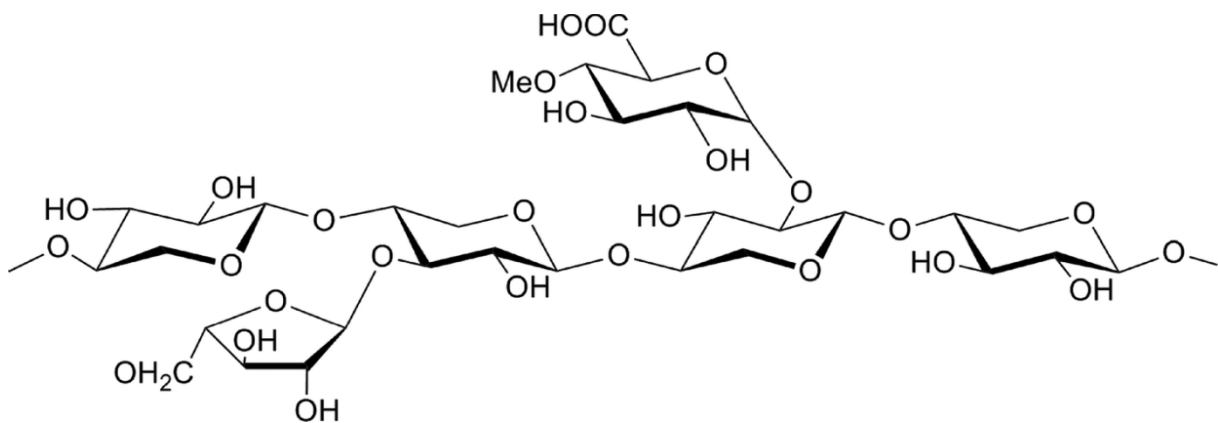
Celuloza je najzastupljeniji polisaharid u prirodi koji je građen od ponavljajućih jedinica celobioze (dimer glukoze). To je glukanski polimer sastavljen od D-glukopiranoznih jedinica, koje su međusobno povezane β -1,4- glukozidnim vezama (Rowell i sur., 2005.). Broj glukoznih jedinica u jednoj molekuli celuloze iznosi 9 000-10 000, a u nekim sirovinama i do 15 000 (Rowell i sur., 2005.). U staničnoj stijenci biljaka, molekule celuloze međusobno su povezane vodikovim vezama i tvore mikrovlakna, koja su povezana u vlakna (Sjostrom 1993). Iako se najveći dio celuloze u lignocelulozi nalazi u kristaličnom obliku, mali udio celuloze je amorfne strukture koja je dostupna djelovanju celulitičkih enzima.



Slika 2. Struktura celuloze (Baptista i sur., 2013.)

2.1.3. Hemiceluloza

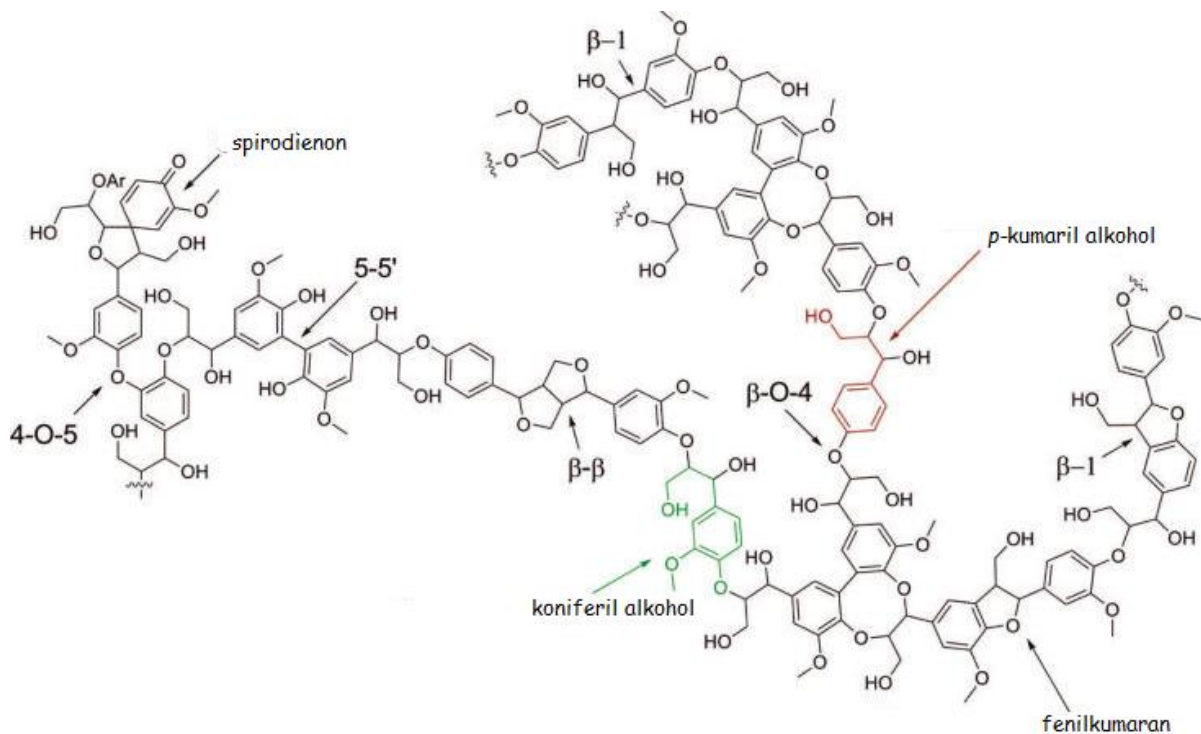
Hemiceluloza je polimer građen od različitih šećera heksoza (D-glukoze, D-manoze, D-galaktoze, L-ramnoze) i pentoza (D-ksiloze, L-arabinoze) i nekih drugih šećera. Ponekad može sadržavati i acetilne i metilne jedinice. Stupanj polimerizacije hemiceluloze manji je nego u celulozi, a dostiže oko 100-200, uglavnom u razgranatoj strukturi (Rowell i sur., 2005.). Zahvaljujući velikom udjelu amorfne strukture građene od različitih šećera, hemiceluloza je bolje topljiva u vodi i lakše razgradiva nego celuloza. U lignoceluloznim materijalima, celuloza i lignin su čvrsto povezani pomoću hemiceluloze koja predstavlja „ljepilo“ između ta dva dijela (Fengel i Wegener 1984.).



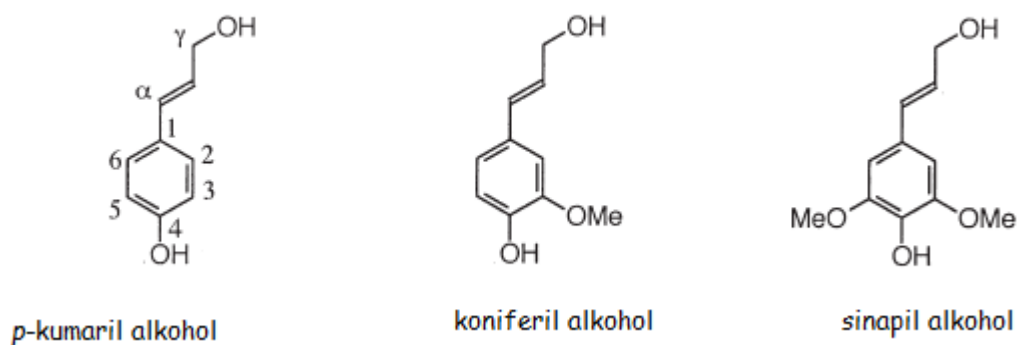
Slika 3. Struktura hemiceluloze (Chen i sur., 2014.)

2.1.4. Lignin

Pored celuloze, lignin je najzastupljenija polimerna organska molekula u prirodi. Lignin daje biljci mehaničku čvrstoću stanične stijenke, nepropusnost, djeluje kao potporanj (lignin, uz celulozu, izgrađuje sekundarnu staničnu stijenku koja nastaje kada je biljna stanica u potpunosti razvijena) te štiti biljku od patogenih organizama i oksidativnog stresa (Hendriks i Zeeman, 2009.) To je složeni amorfni polimer građen od fenilpropanskih jedinica međusobno povezanih eterskim ili C-C vezama. Sastav i struktura lignina se razlikuju ovisno o vrsti lignocelulozne sirovine. Lignini mogu biti klasificirani na više načina, ali su uglavnom podijeljeni prema gradivnim elementima (Sjostrom, 1993.). Lignin nastaje polimerizacijom fenilpropanskih jedinica koji se nazivaju još i monolignolni monomeri. Najzastupljeniji monolignoli u ligninu iz drveta su *p*-kumaril, koniferil i sinapil alkohol (Rowell i sur., 2005.).



Slika 4. Struktura lignina (Zakzeski i sur., 2009)



Slika 5. Struktura tri osnovna monolignola (Grabber, 2005.)

2.2. PREDOBRAĐA LIGNOCELULOZNE SIROVINE

2.2.1. Metode predobrade

Tijekom godina, mnoge su različite tehnologije razmatrane u potrazi za jednostavnim i ekonomski isplativim postupkom predobrade lignocelulozne biomase s ciljem dobivanja visokog prinosa jednostavnih fermentabilnih šećera iz celuloze i hemiceluloze. Te metode se mogu kategorizirati kao 1) fizikalne, 2) fizikalno-kemijske, 3) kemijske i 4) biološke. Svaka od tih metoda ima svoje prednosti i nedostatke, tako da najadekvatnija metoda još uvijek nije razvijena (Yang i Wyman, 2008).

Svrha prethodne obrade je uklanjanje lignina i hemiceluloze, smanjenje kristalične strukture celuloze i povećanje poroznosti lignoceluloznog materijala. Prethodna obrada mora ispuniti sljedeće zahtjeve:

- (1) omogućiti formiranje jednostavnih šećera ili omogućiti oslobađanje šećera nakon enzimske hidrolize;
- (2) spriječiti degradaciju ili gubitak ugljikohidrata;
- (3) spriječiti formiranje nusprodukata odnosno inhibitora hidrolize i fermentacije;
- (4) smanjiti energetske troškove izdvajanja proizvoda i troškova za zbrinjavanje otpada;
- (5) povećati ekonomsku isplativost bioprocesa (Sun i Cheng, 2002.).

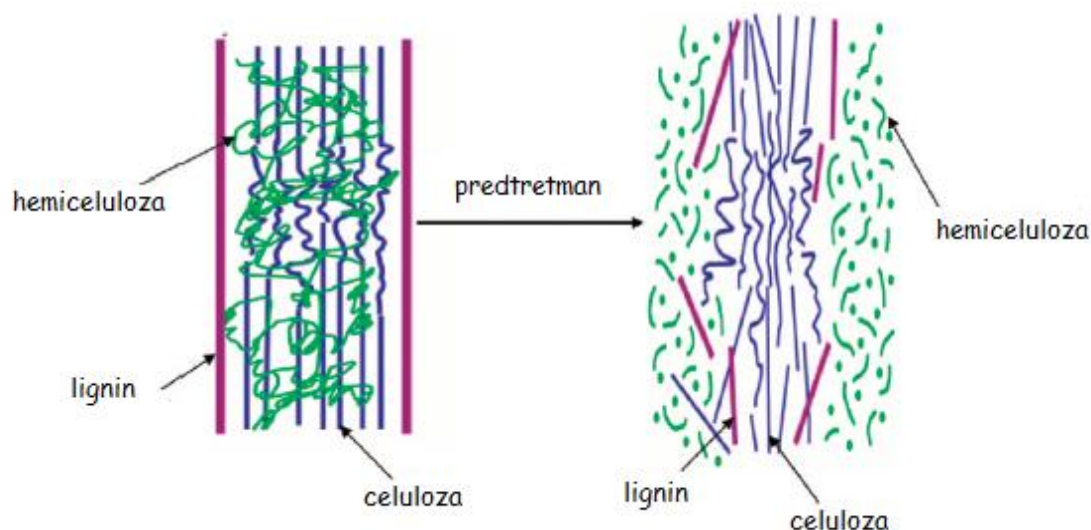
Fizikalne metode obuhvaćaju mehaničko usitnjavanje sirovine poput mljevenja, usitnjavanja i drobljenja, tretman parom ili γ -zrakama, te pirolizu, koje za cilj imaju smanjenje kristaličnosti celuloze, te djelomično ili potpuno hidroliziranje hemiceluloze

(Kumar 2009., Sun i Cheng 2002.). Nedostatak ovih metoda je potreba za velikom količinom energije i slabo uklanjanje lignina (Alvira et al. 2005).

Fizikalno-kemijske metode obuhvaćaju eksploziju vodenom parom, amonijakom ili CO₂ i predtretman toplom vodom. Prednosti ovih metoda su odsustvo agresivnih kemikalija, mali uoštak energije i efikasna hidroliza, te mali udio nastalih inhibitora (Mosier et al. 2005). Osnovni nedostaci ovih metoda su niži stupanj hidrolize hemiceluloze i mali prinos glukoze iz celuloze (Kumar i sur., 2009.).

Kemijska predobrada lignoceluloznih sirovina osigurava povećanje dodirne površine i pora lignocelulozne sirovine, djelomično uklanjajne lignina (delignifikacija), smanjenje stupnja polimerizacije lignina te djelomičnu ili potpunu hidrolizu hemiceluloze. Nedostaci kemijske predobrade su korištenje agresivnih kemikalija, te potrebe za njihovim zbrinjavanjem kao i procesna oprema otporna na djelovanje kemikalija. Prednost kemijske predobrade je efikasnost. Najčešće se koriste anorganske kiseline (koncentrirane i razrijeđene), lužine, organska otapala ili ionske tekućine (Silvestein, 2009.).

U biološkoj predobradi lignoceluloznih sirovina koriste se mikroorganizmi poput plijesni i saprofitnih gljiva koje razgrađuju lignin i hidroliziraju hemicelulozu (Taherzadeh, 2008., Kumar 2009., Sun i Cheng 2002.). Prednosti biološkog procesa predobrade su nizak utrošak energije i jednostavnost postupka, a nedostaci su visoka cijena, osjetljivost mikroorganizama na derivate lignina, mali prinos i duže vrijeme trajanja bioprocasa u odnosu na ostale metode (Sun i Cheng, 2002.).



Slika 6. Shema uloge predobrade u biokonverziji biomase u biogorivo (Kumar i sur., 2009.)

2.2.2. Fizikalno-kemijska predobrada- eksplozija vodenom parom

Eksplozija vodenom parom, poznata kao i autohidroliza, je najčešće korištena metoda za prethodnu obradu lignoceluloznih materijala. Voda djeluje kao kiselina pri visokim temperaturama. U ovoj se metodi usitnjena biomasa tretira visokim tlakom zasićene pare tijekom određenog vremena, a zatim se pritisak naglo smanjuje, odnosno provodi se eksplozivna dekompresija. Predtretman vodenom parom obično započinje na temperaturi od 200-210 ° C uz tlak od 20-50 bara kroz nekoliko sekundi do nekoliko minuta prije nego što je materijal izložen atmosferskom tlaku, iako se proizvoljno može odabrati drugi interval tlaka i temperature (Hamelinck i sur., 2005.). Čimbenici koji utječu na predtretman parnom eksplozijom je vrijeme zadržavanja, temperatura, veličina čestica biomase i sadržaj vlage (Sun i Cheng, 2002.). Smjesa biomase i pare se održava u određenom vremenskom periodu s ciljem odvijanja hidrolize hemiceluloze, a postupak se prekida eksplozivnom dekompresijom. Proces uzrokuje degradaciju hemiceluloze i transformaciju lignina zbog visoke temperature, čime se povećava mogućnost hidrolize celuloze (Kumar i sur., 2009.). Uklanjanje hemiceluloze iz mikrovlakana uzrokuje izlaganje celulozne površine i dostupnost enzima celuloznim mikrovlaknima. Optimalni uvjeti za hidrolizu hemiceluloze se mogu postići visokim temperaturama kroz kratko vrijeme boravka (270 °C, 1 min) ili na nižoj temperaturi kroz duže vrijeme zadržavanja (190 °C, 10 min). Nedavne studije pokazuju da su niže temperature i više vrijeme zadržavanja povoljni (Sun i Cheng, 2002.). Uklanjanje i preraspodjela hemiceluloze i lignina povećava volumen prethodno tretiranog uzorka. Brzo sniženje povišenog tlaka na atmosferski tlak i turbulentni protok materijala uzrokuju fragmentaciju materijala, čime se povećava dostupna površina lignoceluloznog materijala (Garcia-Aparicio i sur., 2006; Kumar i sur., 2009.). Lignin se uklanja samo u ograničenom trajanju tijekom prethodne obrade, ali je raspodijeljen na površinu vlakna kao posljedica topljenja i reakcija depolimerizacije / repolimerizacije (Kumar i sur., 2009.). Ovisno o učinkovitosti obrade, razgradnja celuloze u glukozu može trajati različiti vremenski period (Garcia-Aparicio i sur., 2006; Kumar i sur., 2009.).

2.2.3. Kemijska predobrada- hidroliza kiselinom

Predobradom kiselinom obično se teži velikom prinosu šećera iz lignoceluloznih materijala. Tretman kiselinom uključuje korištenje sulfatne, nitratne ili neke druge mineralne kiseline za uklanjanje komponenata hemiceluloze i izlaganje celuloze enzimskoj hidrolizi (Silverstein, 2008.). Postoje dva osnovna tipa procesa kiselinske hidrolize: hidroliza razrijeđenom kiselinom i hidroliza koncentriranom kiselinom (Tahezadeh, 2007.). Pretretman se može izvoditi ili pri visokim temperaturama i niskoj koncentraciji kiseline (hidroliza razrijeđenom kiselinom), ili pri niskim temperaturama i visokoj koncentraciji kiseline (hidroliza koncentriranom kiselinom) što rezultira hidrolizom celuloze i hemiceluloze na jednostavne monosaharide (Tahezadeh, 2008.). Postupci s kiselinama su skuplji u odnosu na fizikalno-kemijske postupke zbog nužnosti opreme otporne na korozivno djelovanje kiselina. Također, poslije postupka hidrolize neophodna je neutralizacija pH-vrijednosti te izdvajanje soli što dodatno povećava troškove (Hamelinck i sur., 2005.).

2.2.3.1. Hidroliza razrijeđenom kiselinom

Hidroliza razrijeđenom kiselinom je tijekom godina istraživanja uspješno razvijena za predobradu lignoceluloznih sirovina, a posebno dobro je primjenjena za poljoprivredne sirovine poput kukuruzovine i rižine/pšenične slame. Koriste se kiseline s 0,5- 1,5 % kiseline u temperaturnom intervalu od 121°C do 160°C. Ovaj postupak se često primjenjuje u industrijskoj proizvodnji jer je njime postiže relativno velik prinos šećera iz hemiceluloze (Galbe i Zacchi, 2002.). Uz H₂SO₄ kao najčešću, još se koriste i HCl, HNO₃ i H₃PO₄ (Parisi, 1989.). Uspoređujući s predtretmanom koncentriranim kiselinama, ovaj postupak daje manje inhibitora koji nastaju razgradnjom monosaharida ali i manjih problema s korozijom. Ipak, ovakvim predtretmanom mogu nastati i nepoželjni spojevi poput furfurala i hidroksimetilfurfurala koji su inhibitori rasta mikroorganizama, pa je potrebno njihovo uklanjanje (Saha i sur., 2005.).

2.3. INHIBITORI PRISUTNI ILI DOBIVENI HIDROLIZOM LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Predobradom lignoceluloznih sirovina ne nastaju samo fermentirajući šećeri već i mnoge druge komponente poput organskih kiselina i aromatskih spojeva. Neke od tih komponenti imaju inhibirajuće djelovanje u visokim koncentracijama za enzime koji hidroliziraju celulozu do monomernih šećera. Za neke komponente inhibicija nije još dokazana, unatoč očekivanjima zbog njihove strukture i svojstava. Nadalje, interakcija više komponenti nije još uvijek sasvim jasna. Isto tako, neke komponente mogu biti inhibirajuće samo za određene mikroorganizme (Harmsen i sur., 2013.).

2.3.1. Podjela inhibitora

Postoje dvije značajne podjele inhibitora prisutnih kod lignoceluloznih sirovina. Jedna je podjela prema podrijetlu, dok je druga podjela prema kemijskoj strukturi.

Bazirajući se na podrijetlu prisutne su tri skupine:

1. Komponente prisutne u strukturi lignoceluloznih sirovina

Ova kategorija sastoji se od molekula koje su već prisutne u lignoceluloznoj strukturi, ali unutar polimerne strukture, uglavnom lignina. Tijekom predobrade, polimeri se degradiraju do monomera, a depolimerizacija može rezultirati oslobađanjem potencijalno inhibirajućih aldehida i fenolnih komponenti. Kiseline koje su prisutne u strukturi hemiceluloze, poput octene kiseline, glukuronske i galakturonske kiseline, mogu također imati inhibirajuće djelovanje na radni mikroorganizam (Harmsen i sur., 2013.).

2. Komponente nastale degradacijom lignoceluloznih sirovina

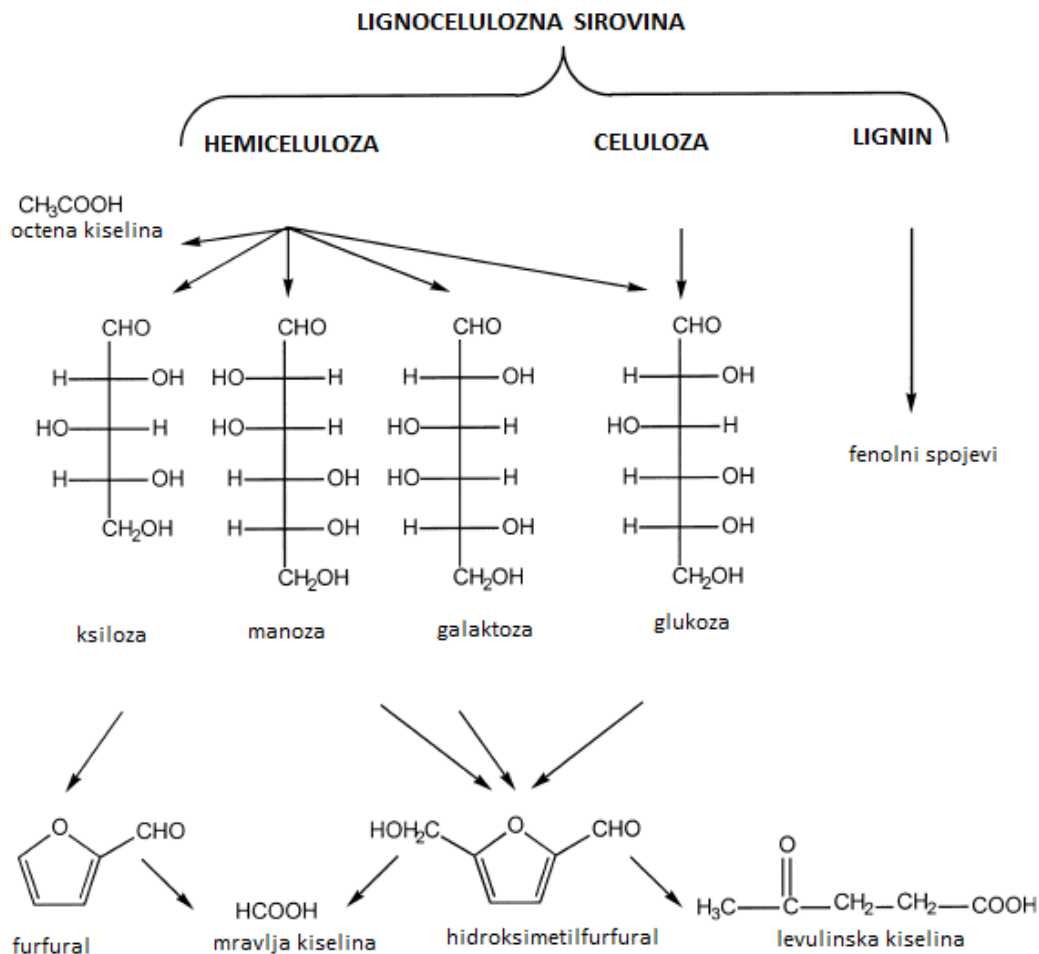
Druga kategorija sastoji se od molekula koje su prisutne kao neinhibirajuće komponente unutar strukture lignina, ali su degradirane tijekom predobrade sirovine. Najistraživaniji su pentoze i heksoze. Pod utjecajem visoke temperature i kiselosti, pentoze se degradiraju do furfurala (furan 2-karbaldehyd), a heksoze se degradiraju do 5-hidroksimetil furfurala (5-HMF). HMF se može degradirati do levulinske kiseline i mravlje kiseline, dok se furfural može degradirati do furoične i mravlje kiseline (Harmsen i sur., 2013.).

3. Komponente prisutne na lignoceluloznim sirovinama

Ove komponente su prisutne na lignoceluloznim sirovinama, ali nisu sastavni dijelovi tih sirovina. Kada sirovina potječe iz zagađenog okruženja u njoj se mogu nalaziti dušikovi i sumporni spojevi, koji znatno mogu utjecati na mikroorganizme. Nadalje, na hidrolizu mogu utjecati i teški metali. Pesticidi i dodaci kemikalija korištenih u poljoprivredi također mogu utjecati na inhibiciju mikroorganizama (Harmsen i sur., 2013.).

Na temelju kemijske strukture, inhibitori se mogu također podijeliti u ove tri skupine: slabe kiseline, derivati furana i fenolni spojevi, dok neki autori spominju i četvrtu skupinu koju čine anorganske soli. Soli ili organske komponente male molekulske mase mogu proći kroz staničnu membranu, u usporedbi s onima velike molekulske mase, gdje inhibiraju ekspresiju i aktivnost transporta šećera i soli u staničnu membranu (Klinke i sur., 2004.). Inhibitori ograničavaju iskorištenje hidrolizata u proizvodnji etanola. Međutim, ako su poznati inhibitori i njihovi identificirani mehanizmi inhibicije, fermentacija se može unaprijediti razvojem specifičnih metoda detoksifikacije, odabirom adekvatnog soja radnog mikroorganizma ili optimiranjem procesa vođenja fermentacije (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 1999.).

Postupci hidrolize koji uključuju obradu lignocelulozne sirovine na visokoj temperaturi pod kiselim uvjetima dovode do formiranja i oslobađanja niza spojeva. Glavni putevi razgradnje su shematski prikazani na slici 7. (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 1999.).



Slika 7. Hidroliza lignoceluloznih sirovina u kiselim uvjetima i na visokoj temperaturi (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 1999.).

Uz nabrojane skupine spojeva, ovisno o vrsti lignocelulozne sirovine, mogu se iz lignina, odnosno monolignola, formirati ostali spojevi poput vanilina, vanilinske kiseline, palmitinske kiseline i drugih kiseline ((Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 1999.).

Dva najznačajnija inhibitora su furfural i hidroksimetilfurfural (HMF). Njihovo djelovanje na kinetiku enzima kvasca važno je za proces nastajanja etanola. Fenolni spojevi su produkti razgradnje lignina, ali nastaju i tijekom razgradnje ugljikohidrata. Derivati furana i fenolni spojevi mogu dalje reagirati formirajući polimerne strukture (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 1999.).

2.4. RADNI MIKROORGANIZMI

2.4.1. Kvasci

Važan faktor za isplativu proizvodnju etanola iz lignoceluloznih sirovina je veliki prinos i produktivnost odnosno velika tolerancija na veliku koncentraciju etanola kako bi troškovi za destilaciju bili što niži (Olofsson i sur., 2008.). Potrebe za mikroorganizmima koji obavljaju reakcije fermentacije lignocelulozne biomase su složenije od onih za konvencionalnu proizvodnju etanola iz mono- ili disaharida, koje provode isključivo sojem kvasca iz roda *Saccharomyces*. Kvasci iz roda *Saccharomyces* proizvode etanol uz veliki prinos etanola (više od 0.45 g etanola/ g glukoze u optimalnim uvjetima). Također imaju vrlo veliku toleranciju na etanol, neki sojevi preko 100 gL⁻¹ etanola. Također, tolerancija prema niskim pH- vrijednostima minimalizira rizik od kontaminacije drugim mikroorganizmima (Olofsson i sur., 2008.). Divlji tip *S. cerevisiae* lako fermentira monosaharide sa 6 ugljikovih atoma poput glukoze, manoze i fruktoze Embden-Meyerhof putem odnosno reakcijama glikolize, dok galaktozu (također C6 monosaharid) fermentira kroz reakcije Leloir puta. Međutim, hidrolizom hemiceluloze nastaju znatne količine pentoznih šećera (C5), ponajprije ksiloze i arabinoze, koje divlji soj *Saccharomyces cerevisiae* ne može fermentirati, osim beznačajne redukcije ksiloze u ksilitol (Olafsson i sur., 2008). Osim toga, hidrolizati lignoceluloznih sirovina sadrže i brojne spojeve koji mogu inhibirati rast kvasca (van Maris i sur., 2006). Na temelju raširene industrijske proizvodnje bioetanola iz C6-supstrata, *S. cerevisiae* je mikroorganizam pogodan za genetičku modifikaciju. Genetski modificiran soj *S. cerevisiae* je prikladan za proizvodnju bioetanola iz drugih izvora ugljika lignoceluloznih hidrolizata (D-ksiloza, L-arabinoza, galakturonska kiseline i L-ramnoza), (van Maris i sur., 2006.). Kvasci koji fermentiraju ksilozu, kao što su *Pichia stipitis* i *Candida shehatae* mogle bi se potencijalno koristiti za uzgoj na podlozi s visokim sadržajem ksilana. Naravno, njihova tolerancija na inhibirajuće spojeve u lignoceluloznim hidrolizatima je relativno mala, a osim toga dobro kontrolirana opskrba kisikom je potrebna za učinkovitu fermentaciju ksiloze (Olafsson i sur., 2008.)

2.4.2. Bakterije

Glavni "konkurenti" stanicama kvasaca su bakterije *Zymomonas mobilis* i genetski modificiran soj *Escherichia coli* (Olsson i Hanh-Hägerdal, 1996). Rekombinantna *Escherichia coli* daje najveće prinose (0,36 - 0,51 gg⁻¹) u nizu različitih hidrolizata. Međutim,

da bi se postigla produktivnost usporediva s onima u laboratorijskom mediju potrebna je detoksifikacija. *Z. mobilis*, obligatno anaerobna bakterija, koja nema funkcionalnog sustava za oksidativnu fosforilaciju, proizvodi etanol i ugljičnog dioksid kao primarne produkte alkoholnog vrenja. *Z. mobilis* koristi Entner-Duodoroff put koji daje manji prinos ATP-a po molu glukoze što daje manji prinos biomase i veći prinos etanola po glukozi u odnosu na *S. cerevisiae*. Međutim, divljem tipu *Z. mobilis*, nedostaje sposobnost da fermentira pentozne šećere. Općenito, čini se da su bakterije manje tolerantne prema inhibitorima nastalih hidrolizom lignoceluloznih sirovina nego kvasci (Olafsson i sur, 2008.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovine

Lignocelulozne sirovine korištene za ovaj rad bile su kukuruzni oklasci, kukuruzovina i slama pšenice. Za analizu je uzeto 400 mg uzorka.

Kukuruzni oklasci i kukuruzovina korišteni za rad potječu od istog soja kukuruza podrijetlom iz okolice Ludbrega. Slama potječe iz Hrvatskog zagorja. U ovom istraživanju određen je sastav tih sirovina prije i poslije procesa njihove predobrade u visokotlačnom reaktoru.

3.1.2. Hranjive podloge

Sastavi hranjivih podloga korištenih u ovom istraživanju prikazani su u tablicama koje slijede u daljnjem tekstu. Uz sastav naveden u tablicama, u svaku su podlogu dodane soli diamonijev fosfat i amonijev sulfat kao izvori makroelemenata u koncentracijama od 1 gL^{-1} , te kvašćev ekstrakt kao izvor aminokiselina, vitamina i ugljikohidrata u koncentraciji od $1,5 \text{ gL}^{-1}$.

3.1.2.1. Hranjiva podloga za uzgoj kvasca za definiranje inhibitornog učinka furfurala

Tablica 1: Sastavi podloga korišteni za određivanje inhibitornog djelovanja furfurala

Sastavi podloga	Ukupni volumen (mL)	Volumen dodanog inokuluma (mL)	Glukoza (gL^{-1})	Furfural (gL^{-1})
1	200	20	50	0
2	200	20	50	0,1
3	200	20	50	0,5
4	200	20	50	1,0
5	200	20	50	2,0
6	200	20	50	3,0
7	200	20	50	4,0
8	200	20	50	5,0
Podloga za uzgoj inokuluma	300	-	50	-

3.1.2.2. Hranjive podloge za uzgoj kvasca u Erlenmeyer tikvicama

Sastav podloga za uzgoj inokuluma i kontrolne podloge naveden je u tablici 2, dok su sastavi hidrolizata slame, kukuruzovine i oklasaka, koji su služili kao podloge za uzgoj u tikvicama, prikazani u tablici 7 (poglavlje 4.2) uz dodatak soli diamonijevog fosfata i amonijevog sulfata (izvor makroelemenata) u koncentracijama od 1 gL^{-1} , te kvašćev ekstrakt (izvor aminokiselina, vitamina i ugljikohidrata) u koncentraciji od $1,5 \text{ gL}^{-1}$.

Tablica 2: Sastav podloge za uzgoj inokuluma i kontrolu kultiviranjem *S.cerevisiae*

Podloga (sastav)	Podloga za inokulum	Kontrolna podloga
Volumen (mL)	300	400
Glukoza (gL^{-1})	50	7,0
Ksiloza (gL^{-1})	0	6,0
Arabinoza (gL^{-1})	0	1,0

3.1.2.3. Hranjive podloge za uzgoj *S.cerevisiae* u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору

Kao hranjive podloge korišteni su hidrolizati slame, kukuruzovine i oklasaka čiji su sastavi prikazani u tablici 7, uz dodatak soli diamonijevog fosfata i amonijevog sulfata u koncentracijama od 1 gL^{-1} , te kvašćev ekstrakt u koncentraciji od $1,5 \text{ gL}^{-1}$.

3.1.3. Mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam, čiji se fermentativni potencijal ispitivao, korišten je divlji soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* izoliran u tvrtki Sladorana d.o.o. Županja.

3.1.4. Ostale kemikalije

Tablica 3: Naziv kemikalija i proizvođača

Naziv kemikalije	Proizvođač
glukoza	Becton
diamonijev fosfat (DAP)	Kemika
amonijev sulfat (AS)	Kemika
kvašćev ekstrakt	Merck
ZnSO_4	Gram-mol
Ca(OH)_2	Proizvodnja gašenog vapna, Hrvatska

3.1.5. Aparature i uređaji

3.1.5.1. Tresilica

Za potrebe pripreme inokuluma u Erlenmayerovim tikvicama korištena je tresilica „Certomat RM“ kao i rotacijska mješalica „RM 71“ (B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka).

3.1.5.2. Spektrofotometar

Promjena optičke gustoće hranjive podloge kao indirektnog pokazatelja rasta stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, određivana je pomoću spektrofotometra „Cary 13E, Varian“ na valnoj duljini od 600 nm.

3.1.5.3. Centrifuga

Za izdvajanje kvašćeve biomase iz hranjive podloge korištena je centrifuga „Harrier 18/80, Sanyo“ pri broju okretaja od 4500 min^{-1} a za izdvajanje kvašćevog hidrolizata broj okretaja od 10000 min^{-1} . Za taloženje krutih čestica iz lignoceluloznih hidrolizata korištena je centrifuga „Beckman, Model J-21B“ pri broju okretaja od 5000 min^{-1} .

3.1.5.4. Vaga

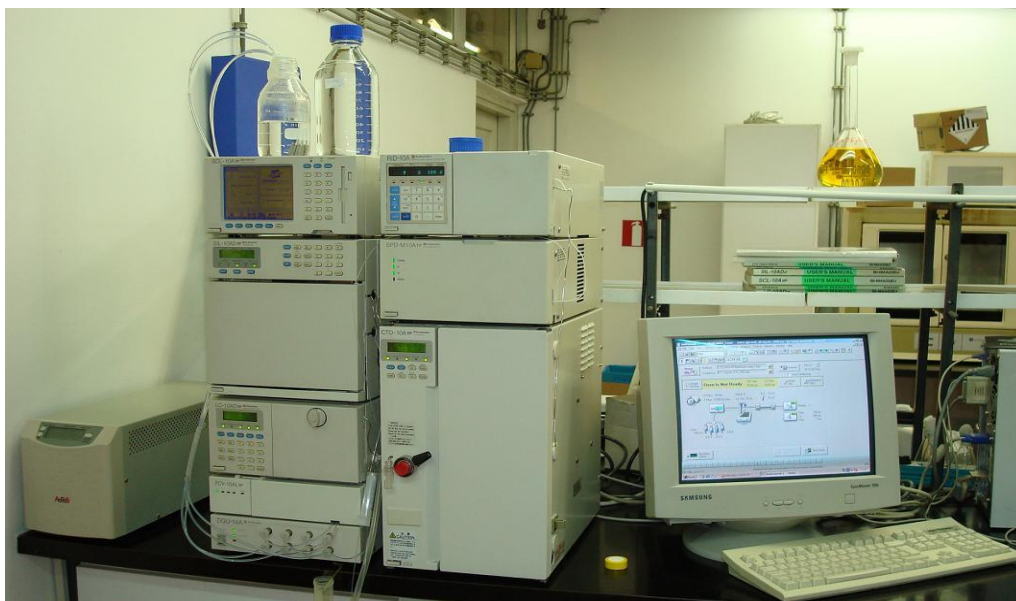
Analitička vaga „Shimadzu“, AX-200 W/O AC ECTA korištena je za određivanje suhe tvari biomase, dok se za sve ostale potrebe vaganja koristila tehnička vaga „Tehtnica“ ET-1211.

3.1.5.5. Sušionik

Za sušenje uzoraka s kvašćevom biomasom izuzetih tijekom ispitivanja inhibitornog djelovanja furfurala prethodno centrifugiranih korišten je sušionik „Instrumentaria ST-50“. Sušionik se koristio i za sušenje lignoceluloznih sirovina kao i svog ostalog laboratorijskog posuđa.

3.1.5.6. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, (HPLC Shimadzu CLASS-VP LC-10A, Kyoto, Japan), određene su koncentracije supstrata i svih produkata alkoholnog vrenja. Uređaj se sastoji od crpke (LC-10Advp), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10ADvp), uređaja za grijanje kolone (CTO-10Avp), analitičke kolone (C610H Supelco, Phenomenex) s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10Avp) i računalnog programa za kromatografiju. Kao mobilna faza korištena je otopina H_3PO_4 (0,1 % vol/vol) u vodi. Volumen analiziranog uzorka iznosio je $30 \mu\text{L}$, a protok mobilne faze $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$.



Slika 8. HPLC- Shimadzu CLASS-VP LC-10AVP sustav (Japan)

3.1.5.7. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)

Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB) korišten je za provođenje procesa proizvodnje bioetanola na polučvrstom supstratu, odnosno na predobrađenoj lignoceluloznoj sirovini. 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 se vrši direktnom parom.



Slika 9. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor

3.1.5.8. Autoklav

Autoklav je korišten za sterilizaciju podloga, laboratorijskog posuda i pribora.



Slika 10. Autoklav

3.1.5.9. Ostala oprema

Od ostalog laboratorijskog pribora korišteno je stakleno posuđe, plamenici, vorteks mješalica i zamrzivač za čuvanje uzoraka i hidrolizata lignoceluloznih sirovina na temperaturi -20°C .

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje inhibitornog djelovanja furfurala

3.2.1.1. Priprema podloge

Pripremljena je podloga ukupnog volumena 2 L za 9 tikvica, čiji su sastavi podloga prikazani u tablici 3. Tikvice su sterilizirane u autoklavu na 121 °C/30 min. U tikvici (800 mL ukupnog volumena) s 300 mL podloge pripremljen je inokulum. Nakon što je podloga ohlađena, u svaku od 8 tikvica je dodan različit volumen furfurala (99%, $M_r=96,06 \text{ g mol}^{-1}$, $\rho=1,16 \text{ g mL}^{-1}$), a zatim je sterilno dodano 20 mL inokuluma (10 % vol/vol) prethodno uzgojenog na podlozi za uzgoj inokuluma (Tablica 3.). Na svaku je tikvicu stavljena vrenjača prethodno dezinficirana formaldehidom. Praćen je anaerobni proces u tikvicama kroz 8 sati.

3.2.1.2. Nadzor procesa alkoholnog vrenja

U svakom satu, uključujući 0. sat uziman je uzorak iz svake tikvice od 6 ml za kontrolu (tikvicu s 0 g L^{-1} furfurala) i 5 mL za ostale uzorke. Iz svakog se uzorka na spektrofotometru očitavala adsorbancija na 600 nm, 0. i 1. razrjeđenje (1 mL originalnog uzorka u 9 mL vode). Originalni uzorak je vraćan u kivetu i stavljan na centrifugiranje na 4500 min^{-1} kroz 15 minuta. Supernatant je odvajan i korišten za analizu pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (u daljnjem tekstu HPLC), dok je kiveta s nativnim uzorkom (0 g L^{-1} furfurala) stavljena na sušenje te je nakon toga gravimetrijski određena masa nastale kvaščeve biomase.

1. Određivanje optičke gustoće hranjive podloge

Izuzeti originalni uzorak stavljan je u kvarcne kivete i nakon očitavanja apsorbancije vraćan je u kivetu za daljnju analizu.

Da bi se pripremilo 1. razrjeđenje, u epruvetu s 9 mL sterilne vode otpipetiran je 1 mL originalnog (0. razrjeđenje) uzorka i dobro homogeniziran. Absorbancija uzorka očitavana je na spektrofotometru, model „Cary 13E, Varian“ na valnoj duljini od 600 nm. Kod slijepe probe nije dodan 1 mL uzorka već je dodana čista sterilna podloga. Optička gustoća uzorka izražena je kao razlika apsorbancije uzorka i slijepe probe.

2. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase kvasca

U osušene i izvagane kivete otpipetirano je 3, 4 ili 5 mL uzorka uzetog nakon svakog sata uzgoja. Uzorak je centrifugiran 15 minuta na 4500 min^{-1} . Supernatant je primijenjen za određivanje koncentracije reducirajućih šećera (glukoze), te nastalog etanola i produkata metabolizma kvasca. Kivete s talogom kvaščeve biomase sušene su na $75 \text{ }^\circ\text{C}$ do konstantne mase. Ohlađene kivete vagane su na analitičkoj vagi, a dobivene mase biomase korištene su za određivanje njene koncentracije ($X \text{ [gL}^{-1}\text{]}$) prema slijedećoj ovisnosti;

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

m_{ok} - masa osušene kivete s biomasom,

m_{pk} - masa prazne suhe kivete,

V_{uz} - volumen uzorka

3. Priprema uzorka za HPLC -analizu

Odmjereno je $700 \text{ }\mu\text{L}$ supernatanta uzorka i dodano $700 \text{ }\mu\text{L}$ pripremljene 10%-tne otopine ZnSO_4 (čija je svrha vezati proteine i nečistoće nastale tijekom procesa). Priprema je rađena u dvije paralele. Sadržaj je dobro homogeniziran i ostavljen 20 minuta u mirovanju. Nakon toga uzorci su stavljeni na centrifugiranje na $10000 \text{ min}^{-1}/10 \text{ min}$.

Volumen od 2 mL nastalog supernatanta prebačen je u odmjernu tikvicu od 10 mL , dodana je destilirana voda do oznake i sadržaj je dobro homogeniziran. Tako pripremljeni uzorci filtrirani su kroz mikrobiološki filter ($0,2 \text{ }\mu\text{m}$, Sartorius) i korišteni za HPLC-analizu. Baždarni dijagrami ovisnosti površine pika o koncentraciji analiziranih spojeva nalaze se u Prilogu 1.

3.2.2. Uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u tikvicama

Pripremile su se podloge za uzgoj inokuluma, kontrolna podloga, te tri podloge lignoceluloznih hidrolizata, čiji sastavi su prikazani u tablici 4, na kojima je uzgajan divlji soj kvasca *S. cerevisiae*. U tri tikvice kao podloga služili su hidrolizati slame, oklasaka i kukuruzovine, čiji su sastavi prikazani u tablici 2. Hidrolizati su predobrađeni 1%-tnom

sumpornom kiselinom na temperaturi 210 °C i tlaku od 20 bara i visokotlačnom parom, uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta. Neutralizirani su kalcijevim hidroksidom (pH= 7) i stavljeni na centrifugiranje na 5000 min⁻¹ kroz 10 min. 400 mL svakog odcentrifugiranog hidrolizata je stavljeno u tikvice, dodane su soli i kvašćev ekstrakt te su tikvice začepljene vrenjačama. U sve 4 tikvice (kontrolna i 3 s hidrolizatima) je nacijepljeno 20 mL inokuluma (5 vol/vol). Sastav hidrolizata lignoceluloznih sirovina je prethodno određen pomoću HPLC. Sastavi podloga hidrolizata lignoceluloznih sirovina prikazani su u tablici 4.

Svakog sata sterilno su uzimani uzorci volumena 5 mL, te je određivan ukupan broj stanica nacijepljivanjem na Petrijeve zdjelice, 4. i 5. razrijeđena. Praćena je potrošnja šećera i nastajanje etanola HPLC analizom. U Tablici 3. je prikazan sastav podloge za inokulum i kontrolne podloge. Obje podloge su sterilizirane na 121 °C/30 min. U podlogu za inokulum su nacijepljene kolonije kvasca prethodno porasle na kosoj podlozi, a kasnije je inokulum uzgojen u tikvici, korišten kao inokulum za kontrolnu podlogu te hidrolizatne podloge. Koncentracije šećera u kontrolnoj podlozi podešene su na navedene vrijednosti da bi se dobili približni iznosi koncentracija istih šećera u lignoceluloznim hidrolizatima.

3.2.2.1. Određivanje ukupnog broja stanica kvasca

Napravljeno je 4. i 5. razrjeđenje u sterilnim uvjetima. Po 1 mL 4. i 5. razrjeđenja je nacijepljen na sterilne Petrijeve zdjelice sa sladnom podlogom koje su stavljene na inkubaciju kroz 24 sata na 30 °C. Porasle kolonije su pobrojene te je određen ukupan broj stanica.

3.2.2.2. Priprema uzorka za HPLC-analizu

U kivete za centrifugiranje odmjereno je oko 5 mL homogeniziranog uzorka i stavljeno na centrifugiranje na 4500 min⁻¹ kroz 15 minuta. Supernatantu od 750 µL je dodano 750 µL 10 %-tne otopine cinkovog sulfata. Sadržaj je dobro homogeniziran te ostavljen u mirovanju 20 minuta. Nakon toga su uzorci centrifugirane na 10000 min⁻¹ kroz 10 minuta. 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 Prilogu 1.

3.2.3. Uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору (HRCB)

U ovom istraživanju korišten je horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB) ukupnog volumena 30 L. HRCB je prethodno steriliziran direktnom parom. Korištena intervalna rotacija, 12 minuta bioreaktor rotira brzinom okretaja 20 min^{-1} , a ostalih 48 minuta miruje. Kao podloga korišten je hidrolizat slame istog sastava kao podloga za uzgoj u Erlenmeyer tikvici. Volumeni podloge iznosio je 5 L, a volumen nacijepljenog inokuluma 500 mL. Sterilno su uzimani uzorci kroz 28 sati. Određivan je ukupan broj stanica te potrošnja šećera i koncentracija nastalog etanola pomoću HPLC, a postupci izvođenja navedenih analiza opisani su poglavljima 3.2.2.1. i 3.2.2.2. Ponovljen je eksperiment s hidrolizatom oklasaka odnosno hidrolizatom kukuruzovine kao podlogom pri istim uvjetima.

3.2.4. Određivanje pokazatelja uspješnosti bioprocesa

Za izračunavanje pokazatelja uspješnosti biotehnološkog procesa korištene su sljedeće jednadžbe:

1. Potrošnja supstrata (ΔS)

$$\Delta S = S_0 - S \quad [\text{gL}^{-1}]$$

S_0 = koncentracija supstrata na početku uzgoja

S = koncentracija supstrata na kraju uzgoja

2. Prinos mase biomase (Y_x)

$$Y_p = X - X_0 \quad [\text{gL}^{-1}]$$

X_0 - koncentracija biomase na početku uzgoja

X - koncentracija biomase na kraju uzgoja

3. Prinos produkta (Y_p)

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

P_0 - koncentracija produkta na početku uzgoja

P - koncentracija produkta na kraju uzgoja

4. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu ($Y_{X/S}$)

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad [\text{gg}^{-1}]$$

5. Koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{P/S}$)

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad [\text{gg}^{-1}]$$

6. Produktivnost (P_r)

$$P_r = \frac{Y_p}{t_u} \quad [\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}]$$

t_u - ukupno vrijeme trajanja uzgoja,

7. Specifična brzina rasta biomase (μ)

$$X = X_0 * e^{\mu \Delta t}$$

X - konačna koncentracija biomase,

X_0 - početna koncentracija biomase,

Δt - interval vremena

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} * \ln \frac{X}{X_0} \quad [\text{h}^{-1}]$$

8. Specifična brzina odumiranja biomase (α)

$$-\alpha = \frac{1}{\Delta t} * \ln \frac{X}{X_0} \quad [\text{h}^{-1}]$$

9. Specifična brzina potrošnje supstrata (q_s)

$$-q_s = \frac{-\mu}{Y_{X/S}} - m - \frac{q_p}{Y_{P/S}} \quad [\text{h}^{-1}]$$

m = energija održavanja životnih aktivnosti stanica $[\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}]$

$m = 0,012 \text{ h}^{-1}$ (literaturni podatak, Zeng i Deckerr., 1995.)

10. Specifična brzina sinteze produkta vezanog uz rast (q_p)

$$q_p = \frac{\mu}{Y_{p/x}} \quad [\text{h}^{-1}]$$

$Y_{p/s}$ = masa proizvoda nastala po masi stanica [gg^{-1}]

11. Učinkovitost procesa (E)

$$E = \frac{Y_{p/s}(\text{stvarni})}{Y_{p/s}(\text{teorijski})} * 100 \quad [\%]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

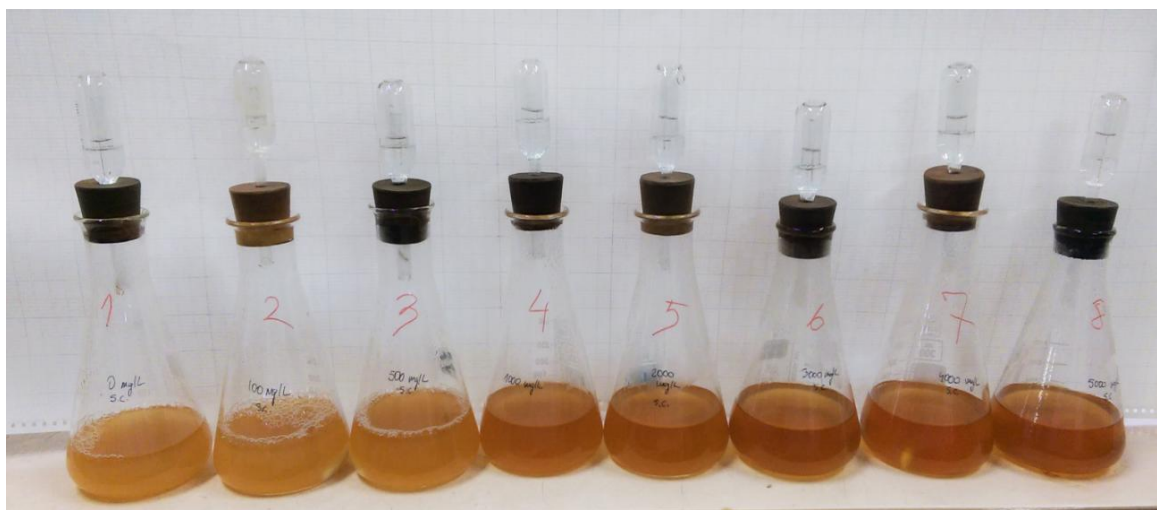
U poglavlju 4.1. prikazani su rezultati ispitivanja utjecaja furfurala na rast kvašćeve biomase, odnosno uspoređivana je koncentracija biomase u podlozi bez furfurala i koncentracija biomase u podlogama s različitim početnim koncentracijama furfurala. Grafovima je prikazana i promjena koncentracija glukoze i etanola tijekom vremena uzgoja, odnosno usporedba vrijednosti koncentracija glukoze i etanola u podlogama s 0,1-5 gL⁻¹ furfurala u odnosu na vrijednosti koncentracije glukoze i etanola u neinhibiranoj podlozi. Nakon svakog rezultata prikazanog dijagramom, slijedi detaljna rasprava i izračun pokazatelja uspješnosti procesa.

Poglavlje 4.2. sadrži prikaz rezultata uzgoja kvasca i proizvodnje etanola na kontrolnoj podlozi i lignoceluloznim hidrolizatima u tikvicama iza kojeg slijedi rasprava o istima. Prikazan je dijagram broja stanica u vremenu uzgoja u kontrolnoj poglozi i lignoceluloznim hidrolizatima. S obzirom da se uzgojem u tikvicama na lignoceluloznim hidrolizatima pokazalo da kvašćeva biomasa može rasti u tim uvjetima, uzgoj se proveo u većem mjerilu.

Poglavljem 4.3. prikazani rezultati uzgoja kvašćeve biomase i proizvodnje etanola u većem mjerilu odnosno HRCB. Zasebnim dijagramima su prikazani sastavi lignoceluloznih hidrolizata tijekom uzgoja tj koncentracije komponenata koje su analizirane. Nakon dijagrama slijedi rasprava o istim te prikaz pokazatelja uspješnosti procesa. Grafovima je prikazana promjena ukupnog broja stanica kvasca tijekom ukupnog vremena uzgoja.

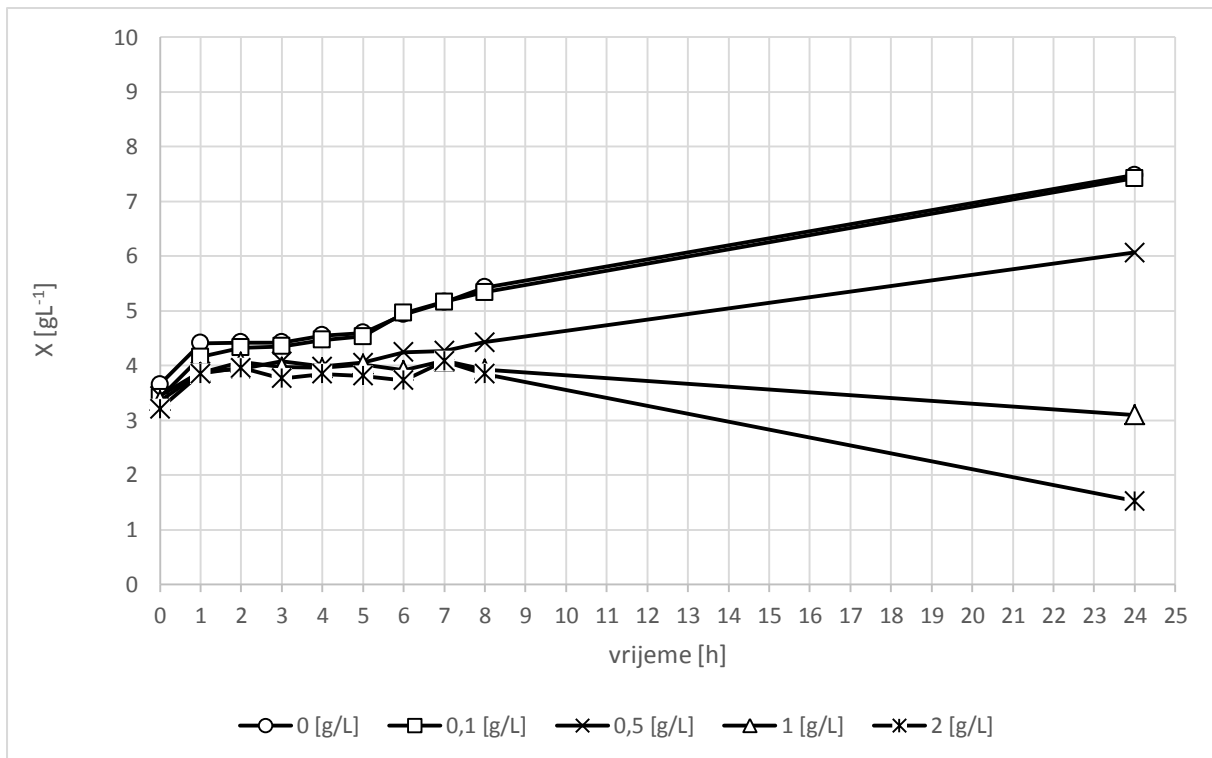
4.1. ISPITIVANJE INHIBITORNOG DJELOVANJA FURFURALA NA KVASAC *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Uzgojem kvasca u podlogama s različitim koncentracijama furfurala, praćen je utjecaj inhibitornog djelovanja tog spoja na rast kvašćeve biomase i nastajanje etanola (Slika 10.). Koncentracija kvašćeve biomase narasla u svakoj podlozi određena je pomoću prethodno napravljenih baždarnih dijagrama ovisnosti optičke gustoće (A) o koncentraciji suhe tvari biomase (X). Baždarni dijagram nalazi se u Prilogu 1. Na slici 11 (a,b) prikazana je ovisnost koncentracije biomase kod različitih koncentracija furfurala o vremenu u odnosu na koncentraciju biomase kvasca bez furfurala. Na slikama 12-18 prikazane su ovisnosti potrošnje glukoze odnosno proizvodnje etanola kod različitih koncentracija furfurala tijekom uzgoja kvasca u odnosu na uzgoj bez furfurala.



Slika 11. Uzgoj biomase kvasca kod različitih koncentracija furfurala

Na slici 11 prikazana je promjena boje hranjive podloge nakon 24 sata uzgoja kvasca na hranjivim podlogama s različitim koncentracijama furfurala (0-5 gL⁻¹). Tijekom uzgoja kvasca u podlogama s koncentracijama furfurala u intervalu od 0-0,5 gL⁻¹ zabilježeno je smanjenje intenziteta boje hranjive podloge kao posljedica potrošnje sastojaka hranjive podloge. Navedena pojava pokazuje da kod tih koncentracija furfurala nije bila prisutna značajnija inhibicija furfuralom.

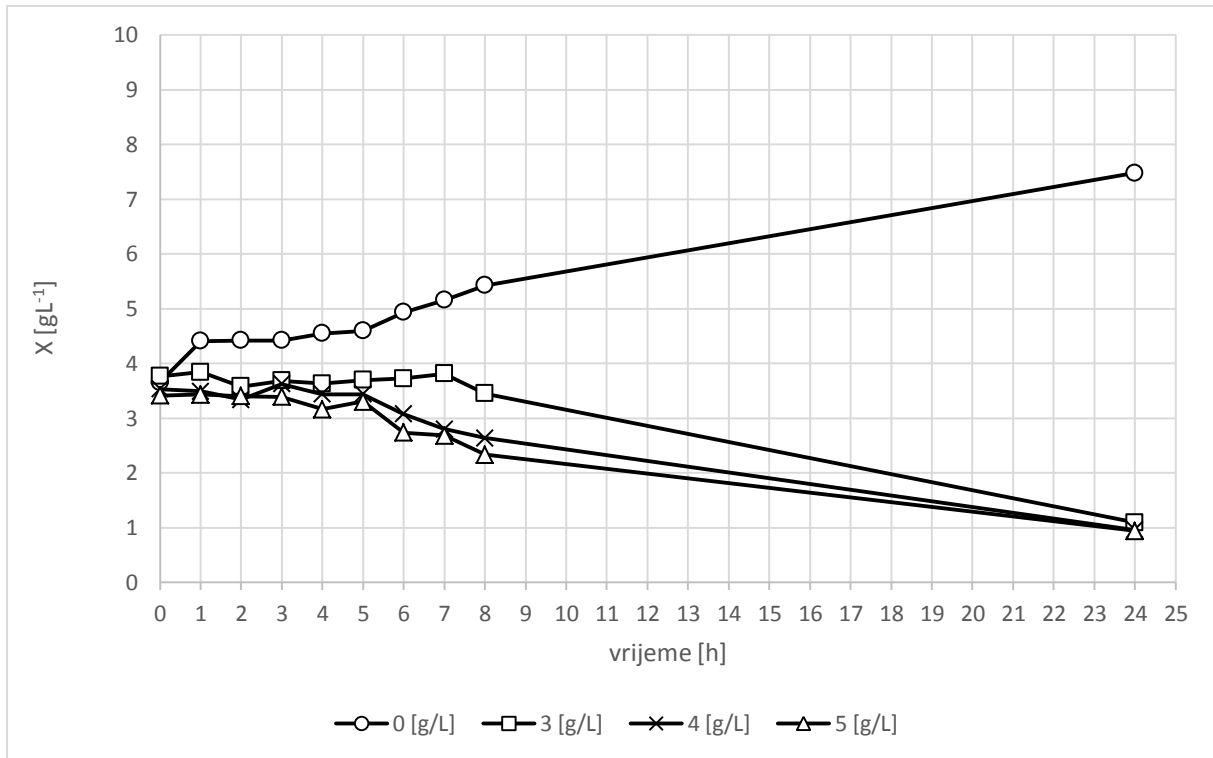


Slika 12a. Promjene koncentracije biomase kvasca [X] tijekom uzgoja na podlozi bez i sa različitim početnim koncentracijama furfurala [0,1-2 gL⁻¹].

Iz slike 12a vidljivo je da kod uzgoja kvasca u podlozi bez furfurala je ostvaren prinos biomase od 0,8 g odnosno 3,83 gL⁻¹ uz produktivnost procesa od 0,16 gL⁻¹h⁻¹. Tijekom uzgoja kvasca na podlozi s 0,1 gL⁻¹ furfurala ostvareni su približno isti pokazatelji uspješnosti bioprocesa kao i kod uzgoja bez dodatka furfurala. Prethodno navedena promjena pokazuje da koncentracija furfurala od 0,1 gL⁻¹ ima zanemariv inhibitorni učinak na rast divljeg soja kvasca *S.cerevisiae*. Povećanje koncentracije furfurala u hranjivoj podlozi na 0,5 gL⁻¹ rezultiralo je vidljivim smanjenjem rasta kvasca što pokazuje da ta koncentracija furfurala ima inhibitorno djelovanje na rast biomase kvasca. Kod koncentracije furfurala od 0,5 gL⁻¹ zabilježeno je smanjenje prinosa biomase Y_x [2,62 gL⁻¹] od 20 % i produktivnosti bioprocesa Pr [0,1 gL⁻¹h⁻¹] od 36 % u odnosu na produktivnost bioprocesa bez dodatka furfurala i koncentracije furfurala od 0,1 gL⁻¹.

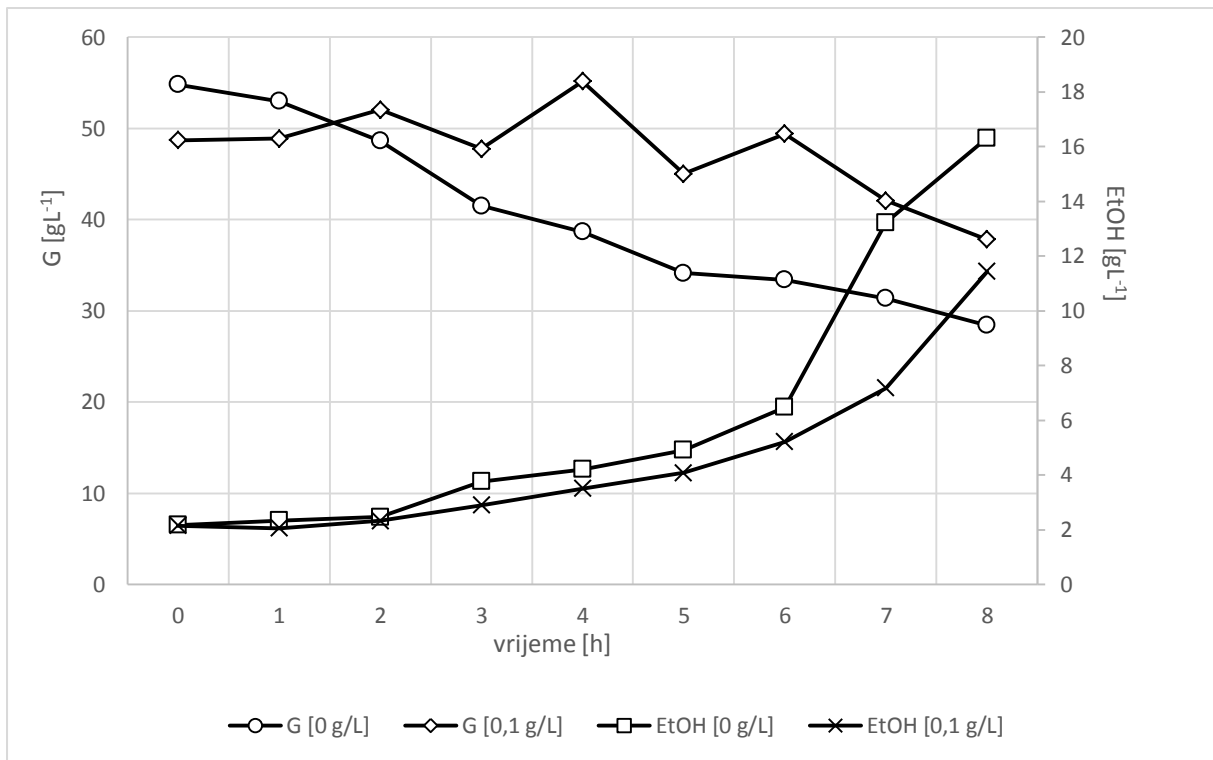
Povećanje koncentracije furfurala na 1 gL⁻¹ rezultiralo je daljnjim smanjenjem pokazatelja uspješnosti bioprocesa. Koncentracija biomase kvasca se smanjuje s vremenom što pokazuje inhibitorno djelovanje furfurala na rast divljeg soja kvasca *S.cerevisiae*. Nadalje, produktivnost bioprocesa je iznosila 0,18 gL⁻¹h⁻¹ što je 60% manje u odnosu na uzgoj kvasca bez dodatka furfurala. Kod povećanja koncentracije furfurala na 2 gL⁻¹ zabilježeno je daljnje smanjenje pokazatelja uspješnosti bioprocesa uz slični trend promjene koncentracije biomase

kvasca kao kod koncentracije furfurala od 1 gL^{-1} . Kod koncentracije furfurala od 2 gL^{-1} zabilježeno je smanjenje prinosa biomase od 80% u odnosu na uzgoj kvasca bez dodatka furfurala.



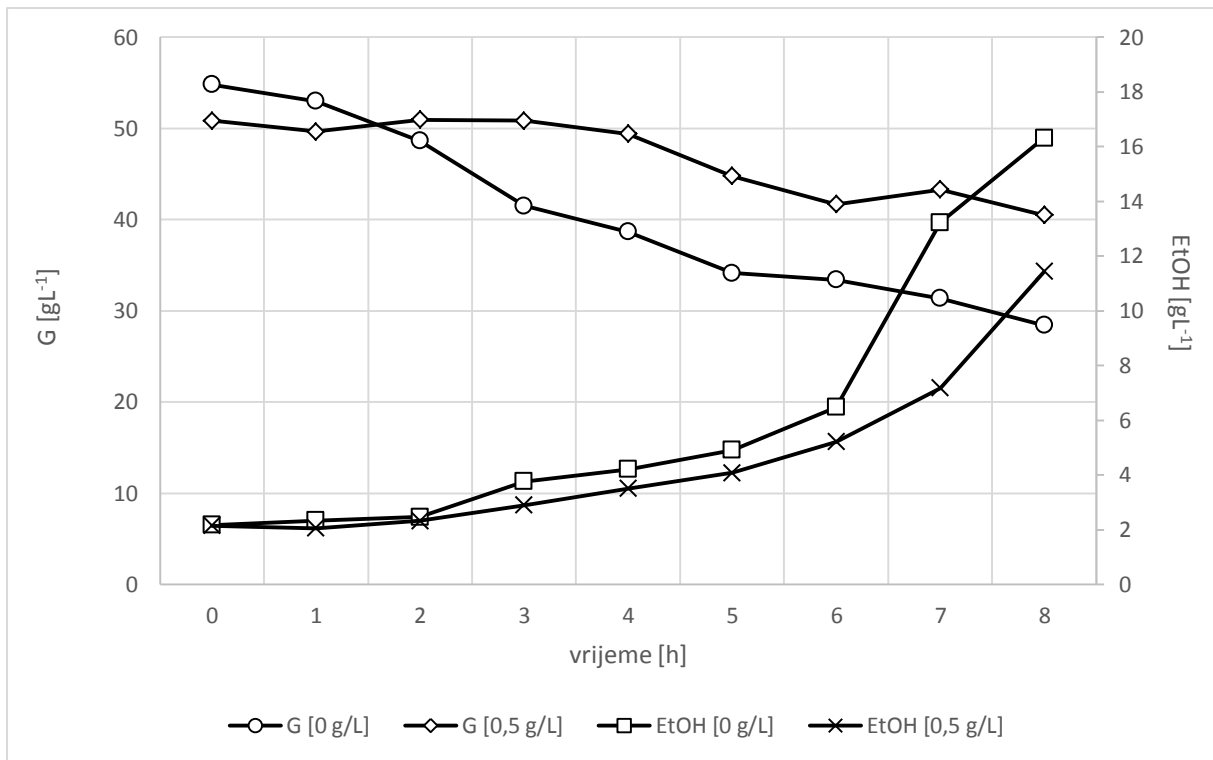
Slika 12b. Promjena koncentracija biomase kvasca [X] tijekom uzgoja na hranjivoj podlozi bez i uz dodatak različitih početnih koncentracija furfurala [$3\text{-}5 \text{ gL}^{-1}$]

Na slici 12b prikazane su promjene koncentracije biomase kvasca bez i uz dodatak furfurala u hranjivoj podlozi od $3\text{-}5 \text{ gL}^{-1}$. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da povećanje koncentracije furfurala značajno inhibira rast divljeg soja kvasca *S.cerevisiae*. Smanjenje produktivnost bioprocasa iznosilo je za 3 gL^{-1} furfurala oko 86% odnosno za 4 i 5 gL^{-1} furfurala preko 90% u odnosu na produktivnost bez dodatka furfurala. Na osnovi rezultata ovog dijela istraživanja može se zaključiti da koncentracije furfurala veće od $0,5 \text{ gL}^{-1}$ značajno utječu na rast divljeg soja kvasca *S.cerevisiae*.



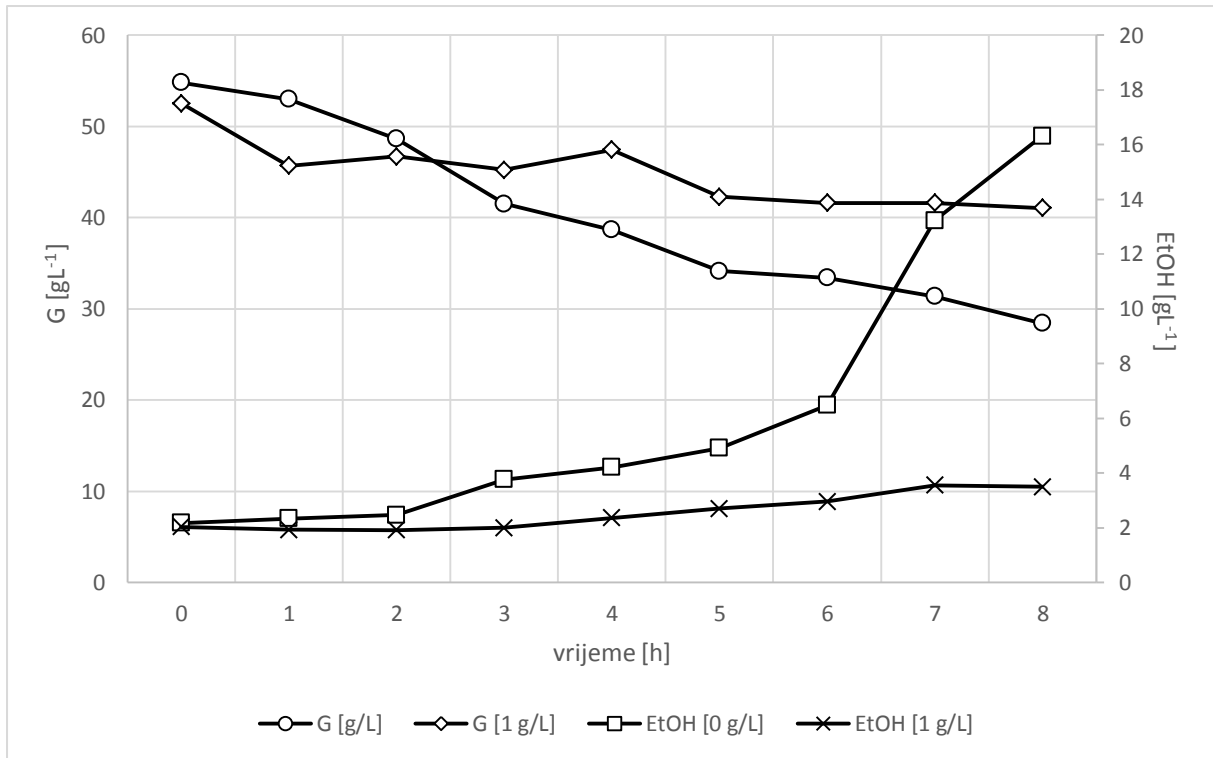
Slika 13. Promjene koncentracije glukoze [G] i etanola [EtOH] tijekom uzgoja kvasca u podlozi bez i uz dodatak $0,1 \text{ gL}^{-1}$ furfurala

Na slici 13 prikazane su promjene koncentracije glukoze i etanola tijekom uzgoja kvasca u podlozi bez i uz dodatak $0,1 \text{ gL}^{-1}$ furfurala. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da je kod uzgoja s $0,1 \text{ gL}^{-1}$ furfurala zabilježena manja koncentracija etanola odnosno veća koncentracija glukoze na kraju uzgoja što pokazuje da i ta relativno mala koncentracija furfurala ima utjecaj na dinamiku odvijanja procesa alkoholnog vrenja, iako kod koncentracije biomase nisu zabilježene značajne razlike tijekom uzgoja kvasca u podlozi bez i s dodatkom furfurala od $0,1 \text{ gL}^{-1}$.



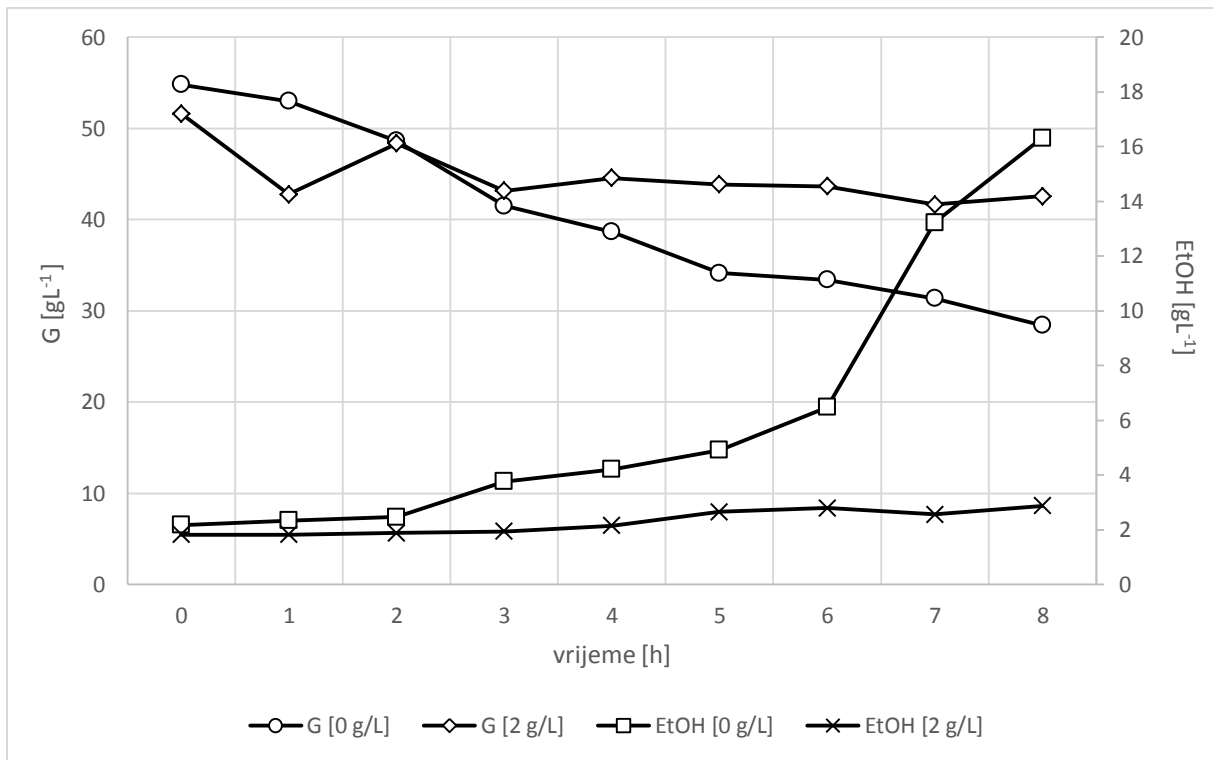
Slika 14. Promjena koncentracija glukoze [G] i etanola [EtOH] u hranjivoj podlozi bez i uz dodatak furfurala od 0,5 gL⁻¹

Na slici 14 prikazane su promjene koncentracije glukoze i etanola u hranjivoj podlozi tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* bez i uz dodatak furfurala od 0,5 gL⁻¹. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je zabilježen sličan trend promjene koncentracije glukoze i etanola kao kod uzgoja kvasca u hranjivoj podlozi s 0,1 gL⁻¹ furfurala. Iako su kod uzgoja kvasca na hranjivoj podlozi s 0,5 gL⁻¹ furfurala zabilježene neznatno veća koncentracije glukoze odnosno manja koncentracija etanola. Na osnovi ovih rezultata može se zaključiti da koncentracija furfurala od 0,5 gL⁻¹ nije značajnije utjecala na dinamiku odvijanja alkoholnog vrenja.



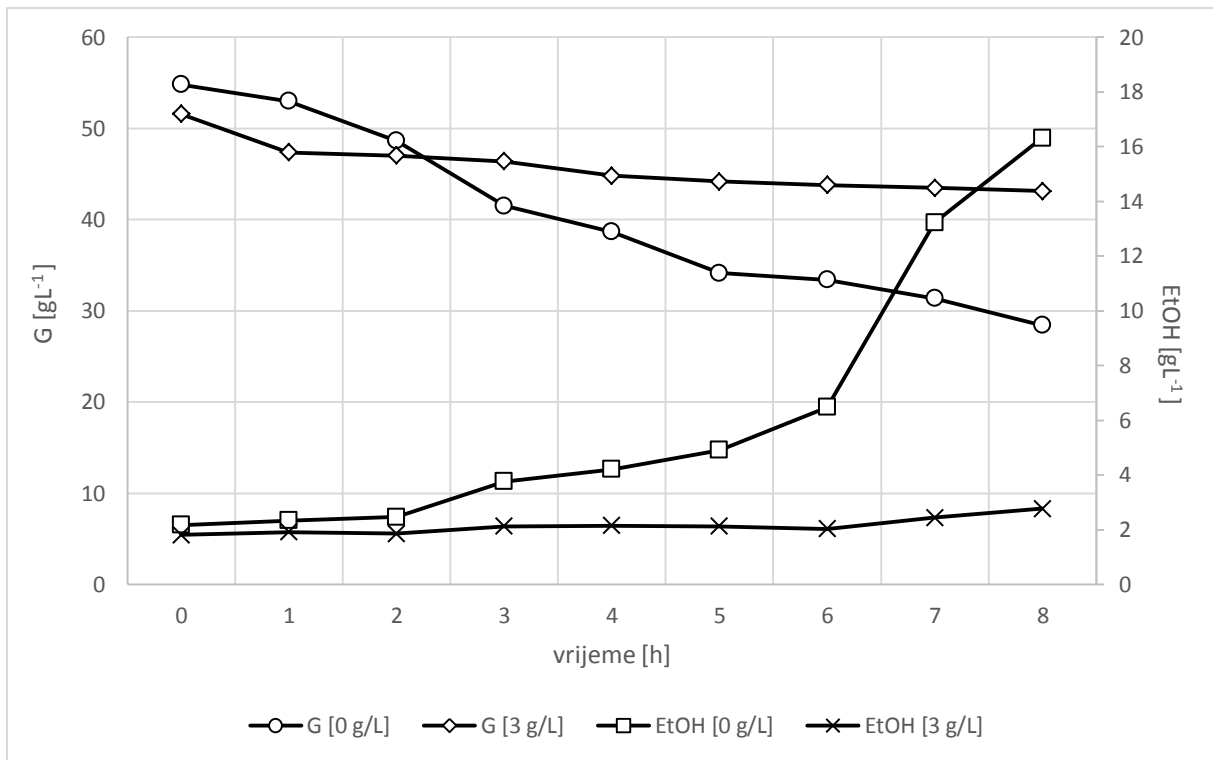
Slika 15. Promjena koncentracija glukoze [G] i etanola [EtOH] u hranjivoj podlozi bez i uz dodatak furfurala od 1 gL^{-1}

Na slici 15 prikazane su promjene koncentracije glukoze i etanola tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* bez i s dodatkom furfurala od 1 gL^{-1} . Rezultati ovog eksperimenta pokazuju da je zabilježeno značajno smanjenje koncentracije etanola na kraju bioprocasa uz približno sličnu koncentraciju glukoze kao kod eksperimenata s $0,1$ i $0,5 \text{ gL}^{-1}$ furfurala. Navedena pojava pokazuje da koncentracija furfurala od 1 gL^{-1} uz to što značajno smanjuje rast biomase kvasca (slika 12a), također značajno smanjuje i proces sinteze alkohola.



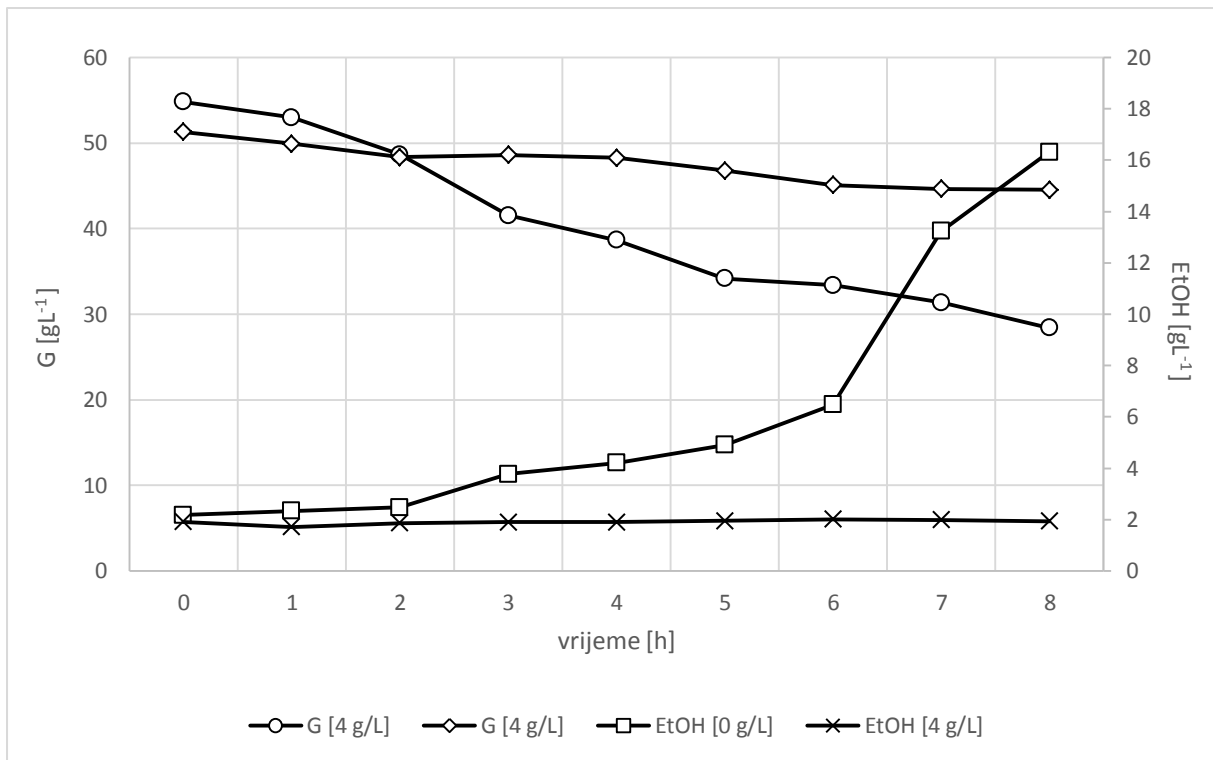
Slika 16. Promjena koncentracija glukoze [G] i etanola [EtOH] u hranjivoj podlozi bez i uz dodatak furfurala od 2 gL^{-1}

Na slici 16 prikazane su promjene koncentracije glukoze i etanola tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* bez i uz dodatak furfurala od 2 gL^{-1} . Na osnovi rezultata ovog eksperimenta vidljivo je da je povećanje koncentracije furfurala u hranjivoj podlozi vezano uz daljnje smanjenje koncentracije etanola odnosno povećanje koncentracije glukoze na kraju bioprocasa. Navedena pojava je u skladu s utjecajem koncentracije furfurala od 2 gL^{-1} na promjenu koncentracije biomase kvasca (slika 12a).



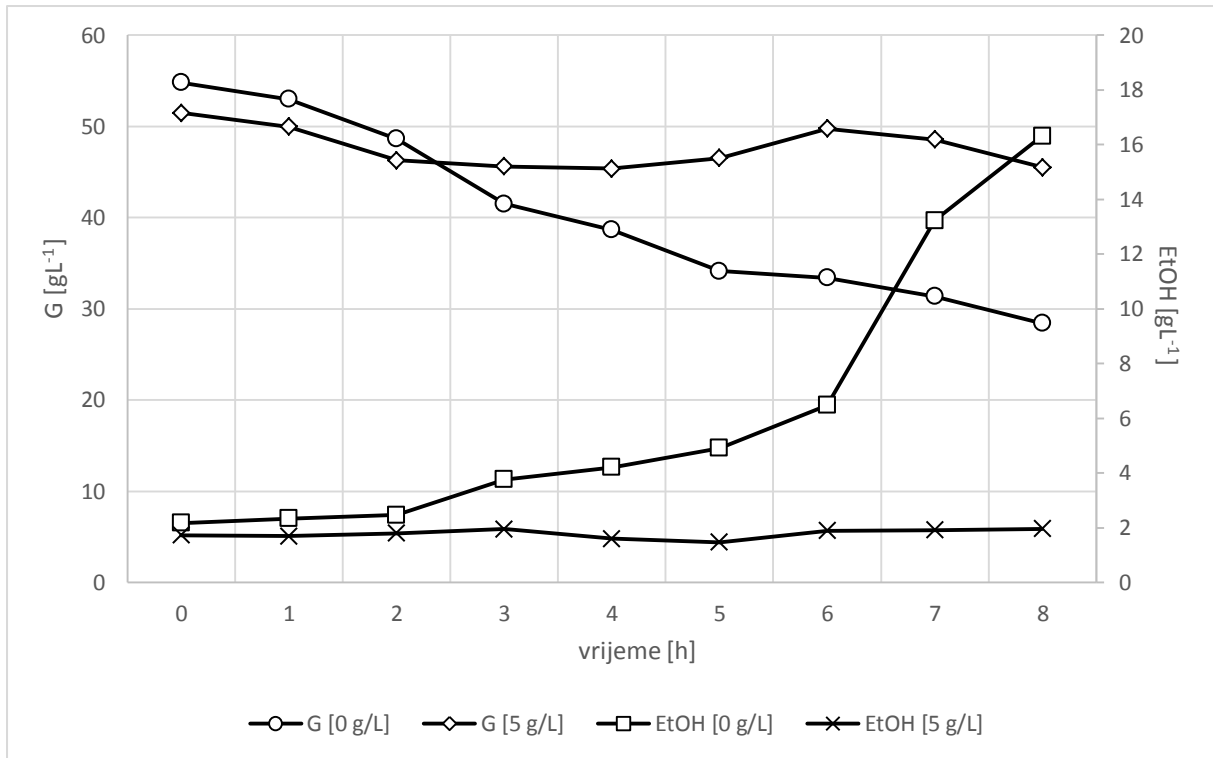
Slika 17. Promjena koncentracija glukoze [G] i etanola [EtOH] u hranjivoj podlozi bez i uz dodatak furfurala od 3 gL^{-1}

Na slici 17 prikazane su promjene koncentracije glukoze i etanola tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* u hranjivoj podlozi bez i uz dodatak furfurala od 3 gL^{-1} . Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da koncentracija furfurala od 3 gL^{-1} značajno utječe na dinamiku odvijanja procesa alkoholnog vrenja, a što je u skladu s utjecajem te koncentracije furfurala na rast biomase kvasca (slika 12b). Nadalje, kod te koncentracije furfurala zabilježeno je neznatno povećanje početne koncentracije etanola koja je unesena u hranjivu podlogu s inokulumom. Neznatno smanjenje koncentracije glukoze posljedica je njene potrošnje za rast biomase i sintezu etanola.



Slika 18. Promjena koncentracija glukoze [G] i etanola [EtOH] u hranjivoj podlozi bez i uz dodatak furfurala od 4 gL^{-1}

Na slici 18 prikazane su promjene koncentracija glukoze i etanola tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* u hranjivoj podlozi bez i uz dodatak furfurala od 4 gL^{-1} . Na osnovi tih rezultata može se zaključiti da koncentracija furfurala od 4 gL^{-1} značajno utječe na rast biomase kvasca (slika 12b), kao i na dinamiku odvijanja procesa alkoholnog vrenja. Navedena pojava vidljiva je kroz činjenicu da nije došlo do povećanja koncentracije etanola odnosno značajnog smanjenja koncentracije glukoze na kraju bioprocasa.



Slika 19. Promjena koncentracija glukoze [G] i etanola [EtOH] u hranjivoj podlozi bez i uz dodatak furfurala od 5 gL^{-1}

Na slici 19 prikazane su promjene koncentracija glukoze i etanola tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* u hranjivoj podlozi bez i uz dodatak furfurala od 5 gL^{-1} . Iz prikazanih rezultata je vidljivo da su zabilježena slične promjene koncentracije glukoze i etanola kao i kod uzgoja kvasca u hranjivim podlogama s 3 ili 4 gL^{-1} furfurala (slika 17 i 18). Na osnovi prethodno navedenog jasno je da koncentracija furfurala od 5 gL^{-1} ima značajni utjecaj na rast kvasca i sintezu alkohola.

Tablica 4. Pokazatelji uspješnosti procesa uzgoja kvasca *S.cerevisiae* i sinteze etanola kod različitih početnih koncentracija furfurala u hranjivoj podlozi

Koncentracija furfurala [gL ⁻¹]	Prinos biomase Y _x [gL ⁻¹]	Potrošnja supstrata ΔS [gL ⁻¹]	Prinos etanola Y _p [gL ⁻¹]	Y _x /s [gg ⁻¹]	Y _p /s [gg ⁻¹]	Produktivnost Pr [gL ⁻¹ h ⁻¹]
0	3,83	26,4	14,14	0,14	0,53	1,77
0,1	4	10,88	9,29	0,36	0,85	1,16
0,5	2,62	10,36	2,91	0,25	0,28	0,36
1	0	11,46	1,46	0	0,12	0,18
2	0	9,05	1,06	0	0,11	0,13
3	0	8,44	0,96	0	0,11	0,12
4	0	6,76	0,03	0	0,004	0,0038
5	0	5,98	0,23	0	0,03	0,03

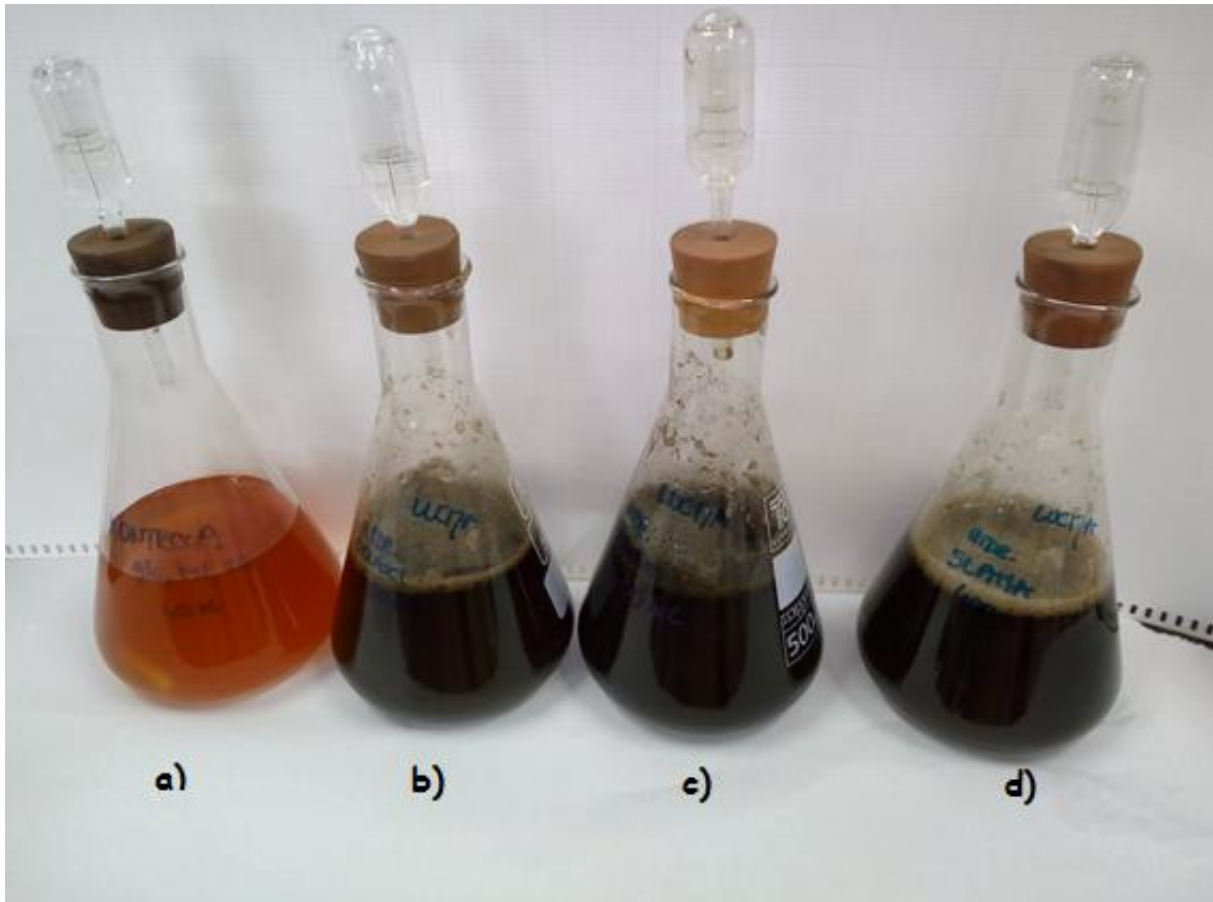
Vrijednost koncentracije kod koje započinje inhibitorno djelovanje furfurala slaže se s literaturnim podacima (Modig i sur., 2002). Potvrđeno je da furfural inhibira aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze (ADH; EC 1.1.1.1), aldehyd dehidrogenaze (ALDH; EC 1.2.1.5) i piruvat dehidrogenaze (PDH). Inhibicija ADH i ALDH furfuralom može biti dobro opisana konkurentnim modelom inhibicije, dok inhibicija PDH je najbolje opisana nekonkurentnim modelom inhibicije (Modig i sur., 2002.). Mala koncentracija dobivenog etanola, ponajprije pri većim koncentracijama furfurala, dokaz je inhibicije navedenih enzima.

Tablica 5. Specifične brzine rasta biomase kvasca, brzine potrošnje supstrata te nastajanja produkta za hranjive podloge s različitim početnim koncentracijama furfurala

Koncentracija furfurala [gL ⁻¹]	Specifična brzina rasta stanica kvasca μ [h ⁻¹]	Specifična brzina odumiranja stanica kvasca α [h ⁻¹]	Specifična brzina potrošnje supstrata q_s [h ⁻¹]	Specifična brzina nastajanja produkta q_p [h ⁻¹]
0	0,03	/	0,241	0,0081
0,1	0,03	/	0,111	0,013
0,5	0,02	/	0,260	0,018
1	/	0,003	/	/
2	/	0,031	/	/
3	/	0,051	/	/
4	/	0,054	/	/
5	/	0,054	/	/

4.2. ANAEROBNI UZGOJ KVASCA *S.CEREVISIAE* NA HIDROLIZATIMA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA U ERLNMEYER TIKVICAMA

U ovom dijelu istraživanja proučavan je anaerobni uzgoj kvasca *S.cerevisiae* na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (pšenična slama, kukuruzni oklasci i kukuruzovina). Sastav tih lignoceluloznih sirovina određen je metodama po NREL (Sluiter i sur., 2010.). Rezultati analiza prikazani su u tablici 6 iz kojih je vidljivo da primjenjene sirovine u ovom istraživanju imaju uobičajen sastav za tu vrstu sirovina. Da bi se navedene sirovine mogle primijeniti u procesu proizvodnje etanola moraju proći proces fizikalne predobrade koji je uključivao proces usitnjavanja i mljevenja. Lignocelulozne sirovine nakon procesa fizikalne predobrade imale su veličinu čestica ispod 1 mm. Tako pripremljene lignocelulozne sirovine podvrgnute su daljnjem procesu predobrade u visokotlačnom reaktoru na 210 °C, tlaku 20 bara, u 1%-tnoj otopini H₂SO₄ u trajanju od 5 minuta. Sastav hidrolizata lignoceluloznih sirovina određen je pomoću visokoučinkovite tekućinske kromatografije (HPLC)., a rezultati su prikazani u tablici 7. Iz prikazanih rezultata je vidljivo da je u sva tri hidrolizata lignoceluloznih sirovina prisutno ukupno preko 10 gL⁻¹ šećera (glukoza, ksiloza i arabinoza). Međutim, zabilježene su i relativno visoke koncentracije furfurala (> 1 gL⁻¹) što pokazuje da će biti prisutno njegovo inhibitorno djelovanje na proces alkoholnog vrenja kvasca. Da bi se pospješio rast kvasca hidrolizatu lignoceluloznih sirovina dodano je 1 gL⁻¹ (NH₄)₂HPO₄ i (NH₄)SO₄ odnosno 1,5 gL⁻¹ kvašćevog ekstrakta (izvor peptida, aminokiselina i vitamina).



Slika 20. Uzgoj kvasca *S.cerevisiae* na različitim hranjivim podlogama:

- a) glukozom, skilozom i arabinozom (kontrolna podloga); b) hidrolizatom kukuruznih oklasaka; c) hidrolizatom kukuruzovine; d) hidrolizaom slame

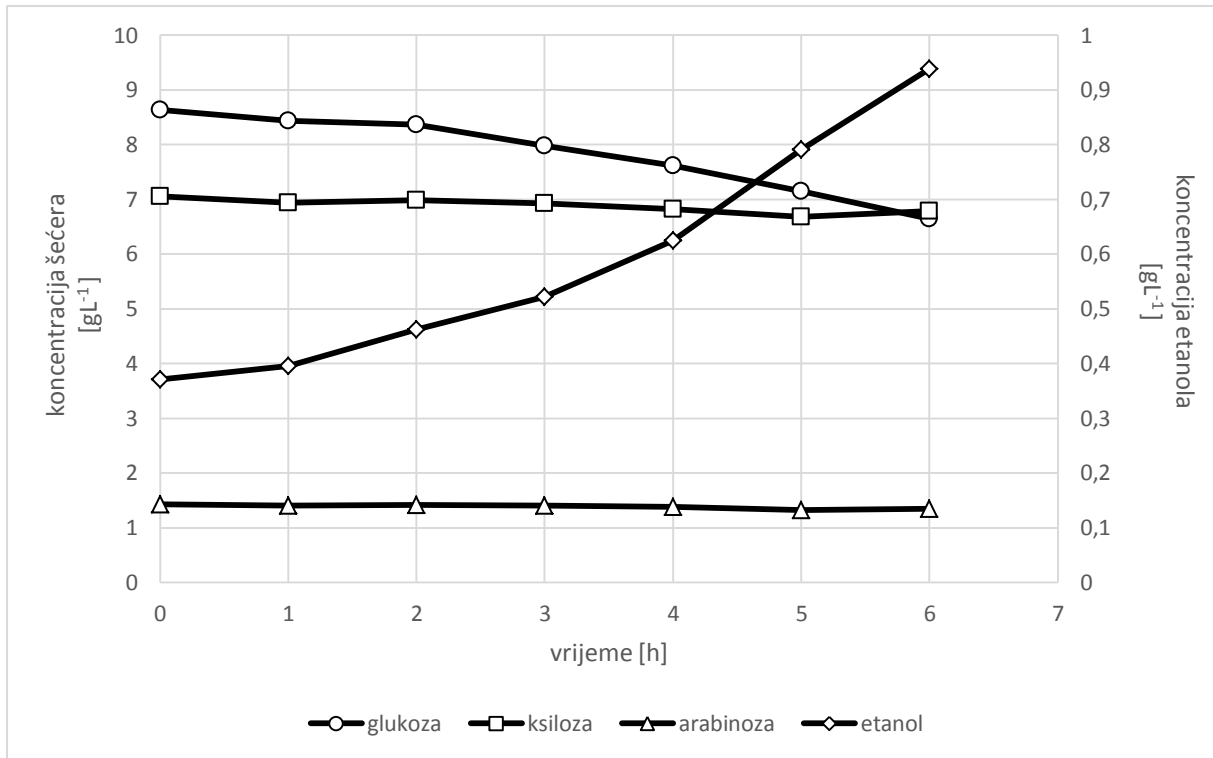
Tablica 6. Sastav lignoceluloznih sirovina prije procesa predobrade

	Pšenična slama		Kukuruzni oklasci		Kukuruzovina	
	[g]	% [g/g slame]	[g]	% [g/g slame]	[g]	% [g/g slame]
Glukani	0,1748	43,7	0,141	35,26	0,1613	40,32
Ksilani	0,0873	21,83	0,1052	26,31	0,0655	16,38
Arabinani	0,01348	3,37	0,0145	3,63	0,0139	3,49
Octena kiselina	0,0065	1,65	0,0174	4,35	0,01429	3,57

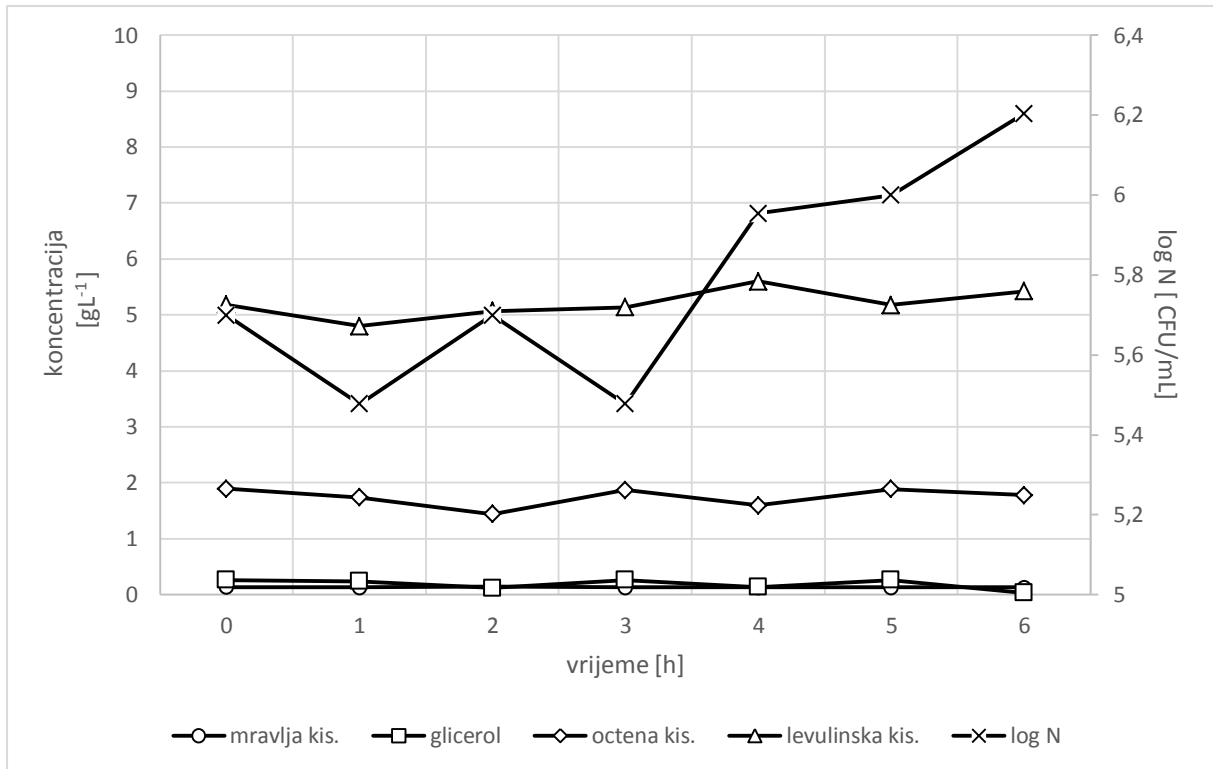
Tablica 7. Sastav hidrolizata lignoceluloznih sirovina (hidrolizat dobiven predtretmanom sirovina u laboratorijskom visokotlačnom reaktoru pri temperaturi od 210 °C, tlaku 20 bara, vremenu zadržavanja 5 minuta te 1 % H₂SO₄ kao katalizator)

Hidrolizat	Slama	Oklasci	Kukuruzovina
Glukoza (gL ⁻¹)	7,19	4,42	4,65
Ksiloza (gL ⁻¹)	2,54	6,03	5,85
Arabinoza (gL ⁻¹)	0,86	1,0	1,11
Furfural (gL ⁻¹)	1,78	1,03	1,4

Budući da su hidrolizati lignoceluloznih sirovina bile vrlo obojene i relativno viskozne hranjive podloge (slika 20), za praćenje rasta biomase kvasca primijenjena je standardna mikrobiološka metoda određivanja broja stanica u hranjivoj podlozi. U ovom dijelu istraživanja kontrolna podloga za anerobni uzgoj kvasca *S. cerevisiae* bila je hranjiva podloga sastavljena od glukoze, ksiloze i arabinoze u koncentracijama sličnim kao kod hidrolizata lignoceluloznih sirovina. Navedeni sastav kontrolne podloge treba omogućiti adekvatnu usporedbu anaerobnog uzgoja kvasca s uzgojem na hranjivoj podlozi dobivenoj od hidrolizata lignoceluloznih sirovina.

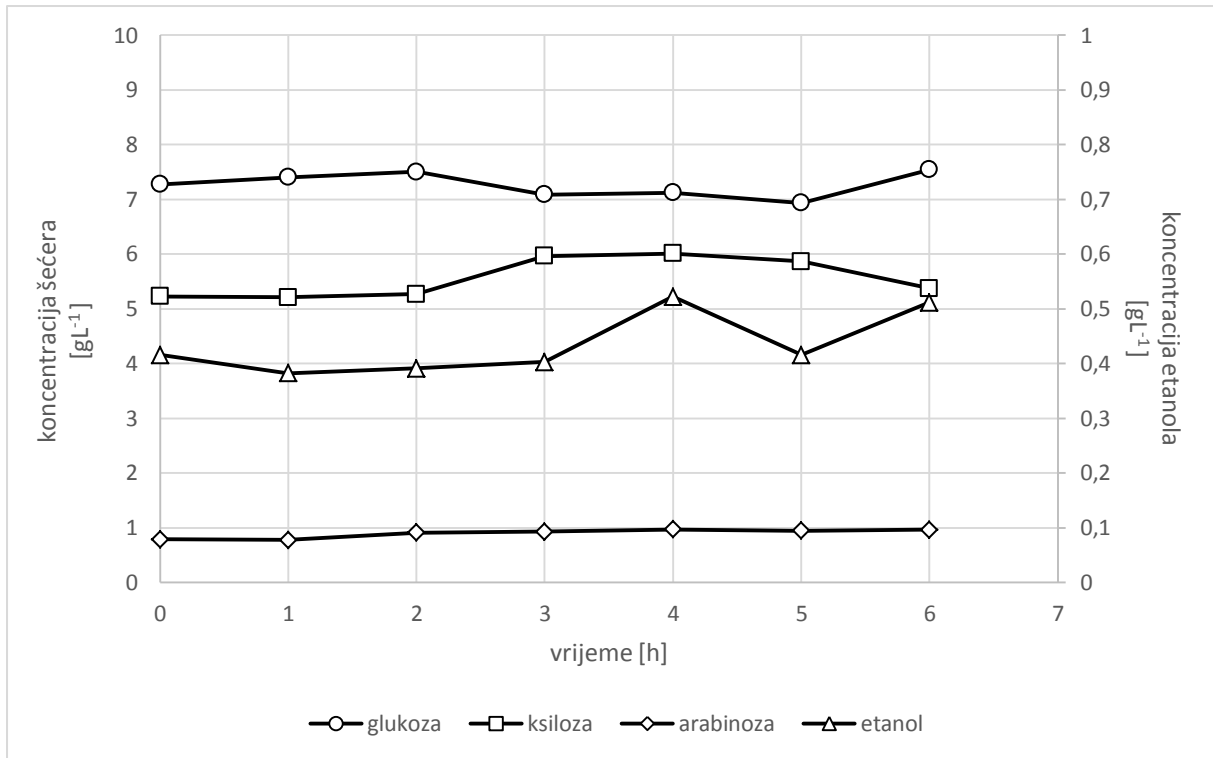


Slika 21a. Promjene koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze i etanola u kontrolnoj podlozi tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* u anaerobnim uvjetima u Erlenmeyer tikvicama

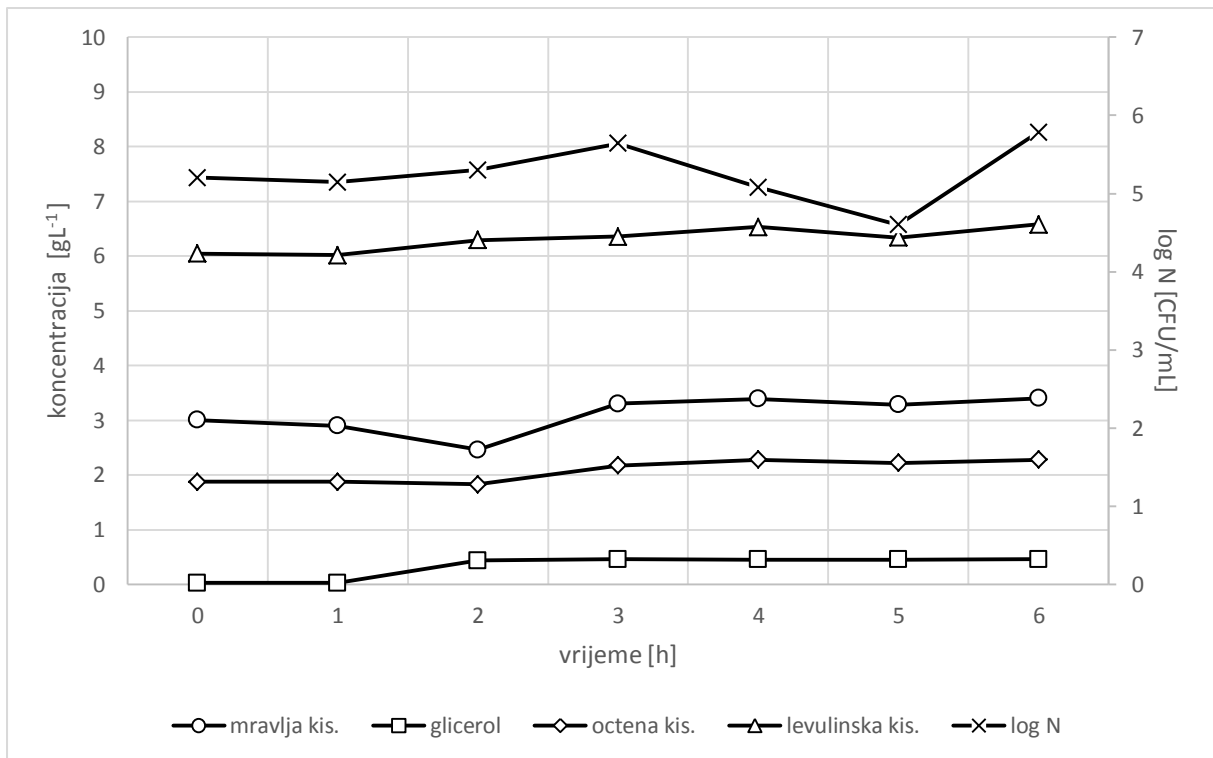


Slika 21b. Promjene koncentracije mravlje, octene, i levulinske kiseline i glicerola odnosno broja živih stanica u kontrolnoj podlozi tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* u anaerobnim uvjetima u Erlenmeyer tikvicama

Rezultati dobiveni anaerobnim uzgojem kvasca *S.cerevisiae* u kontrolnoj podlozi prikazani su na slici 21 (a, b). Iz prikazanih rezultata je vidljivo da je došlo do sinteze etanola uz potrošnju glukoze i ksiloze ali bez potrošnje arabinoze. Nadalje, koncentracije mravlje, octene, levulinske kiseline i glicerola također su bile konstantne tijekom ovog relativno kratkog trajanja bioprocasa. Ovo preliminarno istraživanje imalo je za cilj definirati sposobnost kvasca da koristi monosaharide iz hranjive podloge. Nadalje, rast biomase kvasca vidljiv je kroz povećanje broja stanica kvasca (log N).

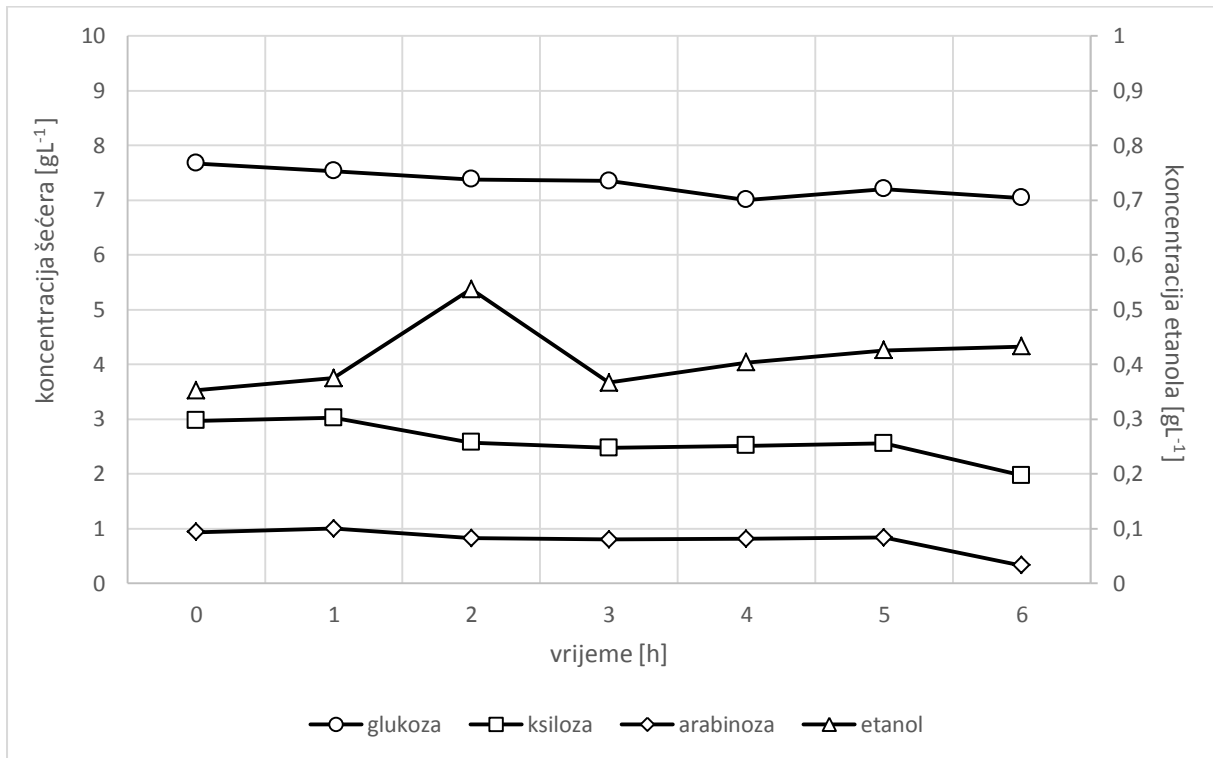


Slika 22a. Promjene koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze i etanola na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruznih oklasaka tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* u anaerobnim uvjetima u Erlenmeyer tikvicama

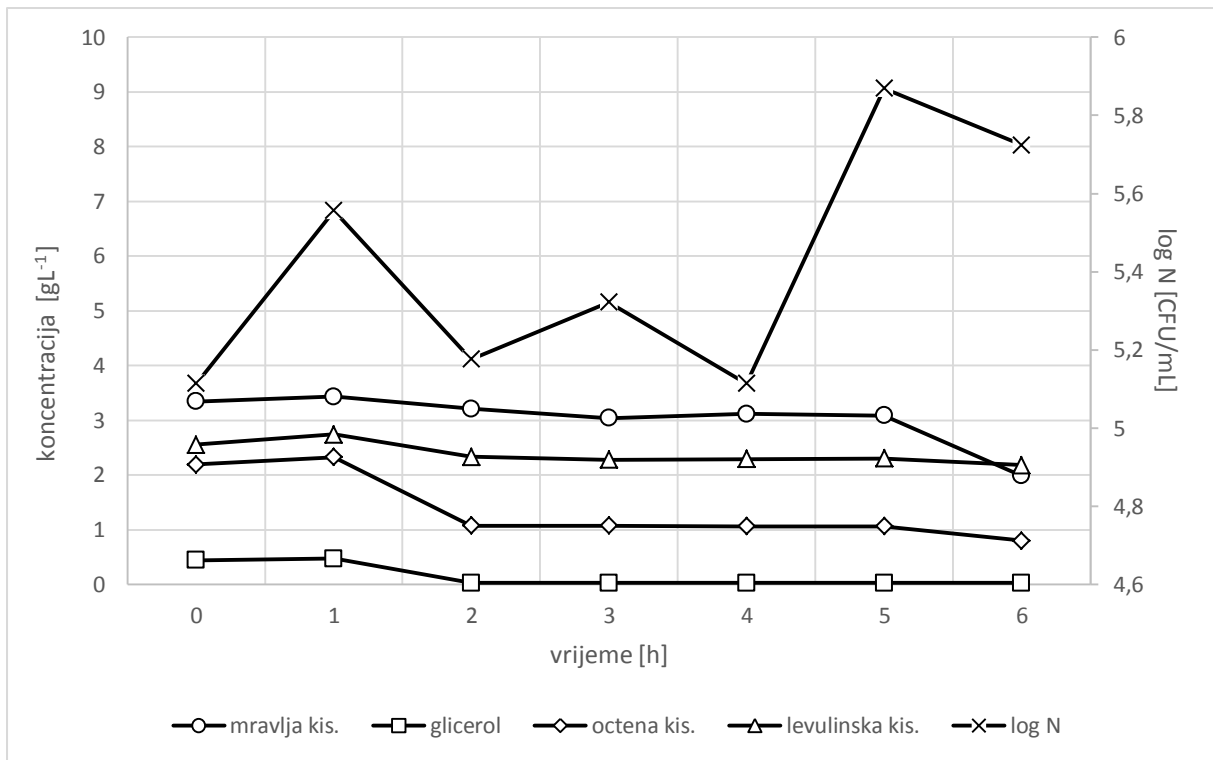


Slika 22b. Promjene koncentracije mravlje, octene, i levulinske kiseline i glicerola odnosno broja živih stanica na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruznih oklasaka tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* u anaerobnim uvjetima u Erlenmeyer tikvicama

Rezultati anaerobnog uzgoja *S.cerevisiae* na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruznih oklasaka prikazani su na slici 22 (a,b). Iz prikazanih rezultata je vidljivo da je kvasac počeo koristiti monosaharide iz hranjive podloge, a dodatno je ovaj proces usporen prisutnošću furfurala u koncentraciji od $1,03 \text{ g/L}^{-1}$ (tablica 6). Prethodno navedena fiziološka aktivnost kvasca *S.cerevisiae* je vidljiva kroz promjenu broja stanica kvasca. Navedeno pokazuje da će lag faza anaerobnog uzgoja kvasca *S.cerevisiae* u HRCB-u biti produžena odnosno da će ukupno trajanje procesa također biti povećano u odnosu na anaerobni uzgoj u kontrolnoj podlozi i podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina.

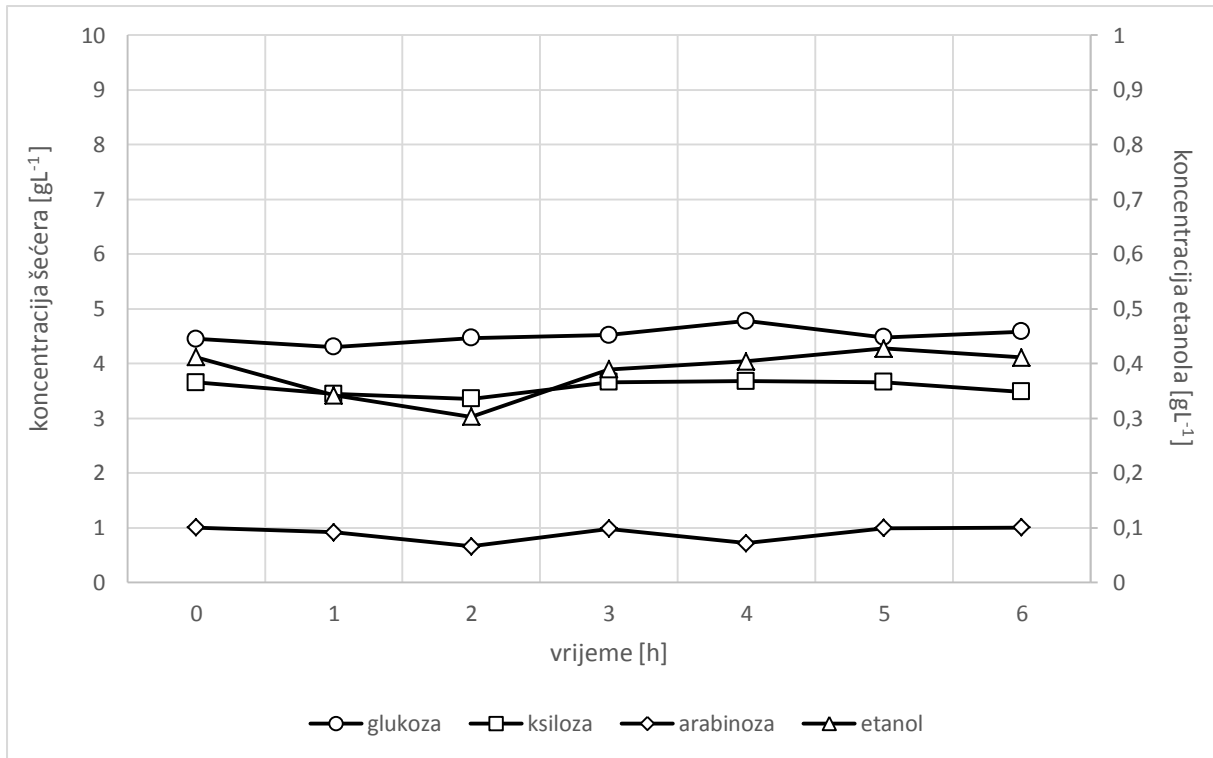


Slika 23a. Promjene koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze i etanola na hranjivoj podlozi s hidrolizatom slame tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* u anaerobnim uvjetima u Erlenmeyer tikvicama

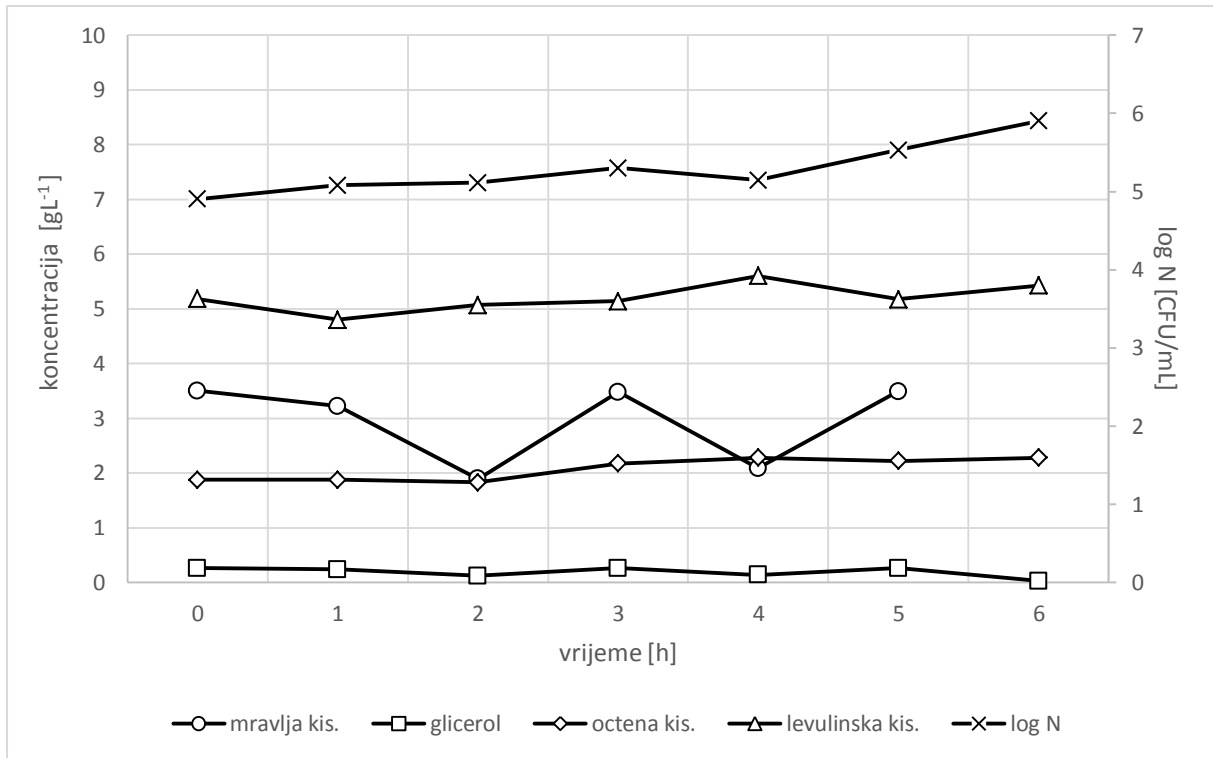


Slika 23b. Promjene koncentracije mravlje, octene, i levulinske kiseline i glicerola odnosno broja živih stanica na hranjivoj podlozi s hidrolizatom slame tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* u anaerobnim uvjetima u Erlenmeyer tikvicama

Na slici 23 (a,b) prikazani su rezultati anaerobnog uzgoja kvasca *S.cerevisiae* na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame. U ovom eksperimentu zabilježena je slična dinamika odvijanja bioprocasa kao i kod anaerobnog uzgoja kvasca u hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruznih oklasaka.



Slika 24a. Promjene koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze i etanola na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruzovine tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* u anaerobnim uvjetima u Erlenmeyer tikvicama



Slika 24b. Promjene koncentracije mravlje, octene, i levulinske kiseline i glicerola odnosno broja živih stanica na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruzovine tijekom uzgoja kvasca *S.cerevisiae* u anaerobnim uvjetima u Erlenmeyer tikvicama

Na slici 24 (a,b) prikazani su rezultati anaerobnog uzgoja kvasca *S.cerevisiae* na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruzovine. Dinamika odvijanja bioprocasa tijekom ovog eksperimenta slična je kao kod anaerobnog uzgoja kvasca u hranjivim podlogama ostala dva hidrolizata lignoceluloznih sirovina (slike 22 i 23).

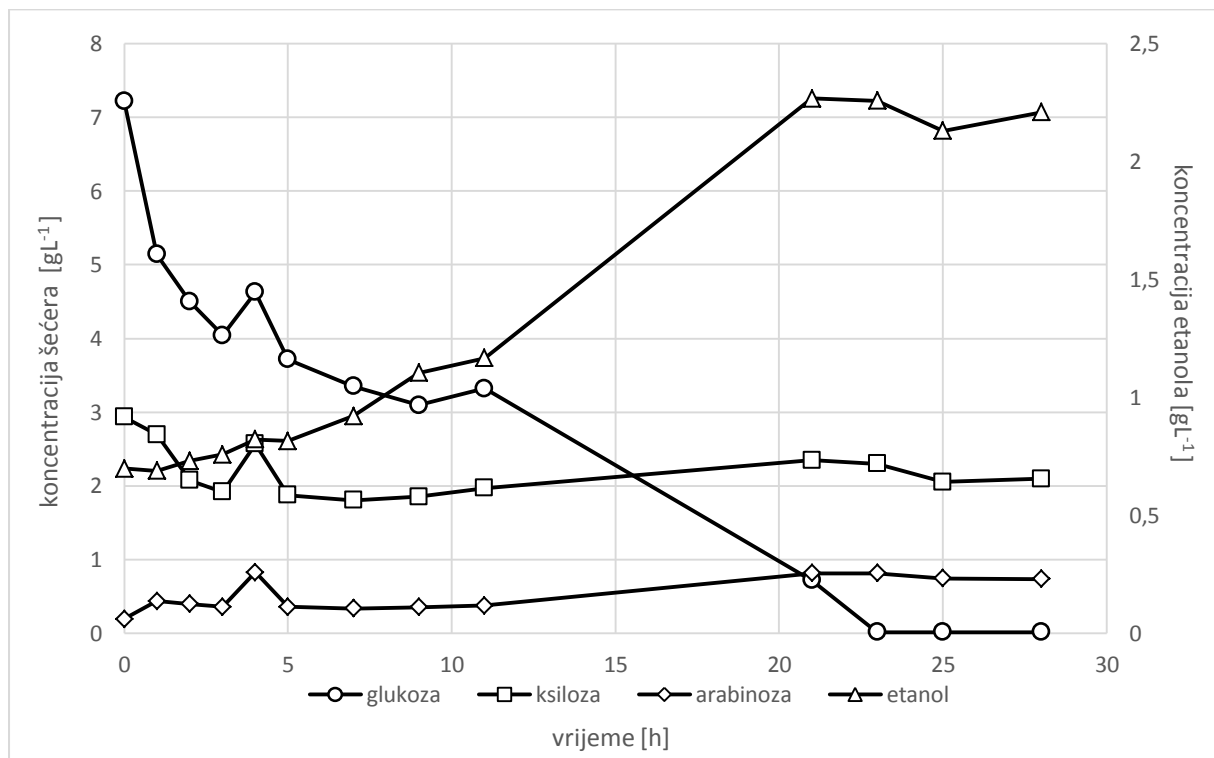
Nadalje, potrebno je istaknuti da su hranjive podloge s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina sadržavale različite inhibitore (furfural, octena, mravlja, levulinska kiselina) što je također utjecalo na dinamiku odvijanja bioprocasa. Međutim, prikazani rezultat ovog dijela istraživanja je sposobnost kvasca da raste na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina.

4.3. ANEROBNI UZGOJ KVASCA *S.CEREVISIAE* NA HIDROLIZATIMA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA U HORIZONTALNOM ROTIRAJUĆEM CIJEVNOM BIOREAKTORU

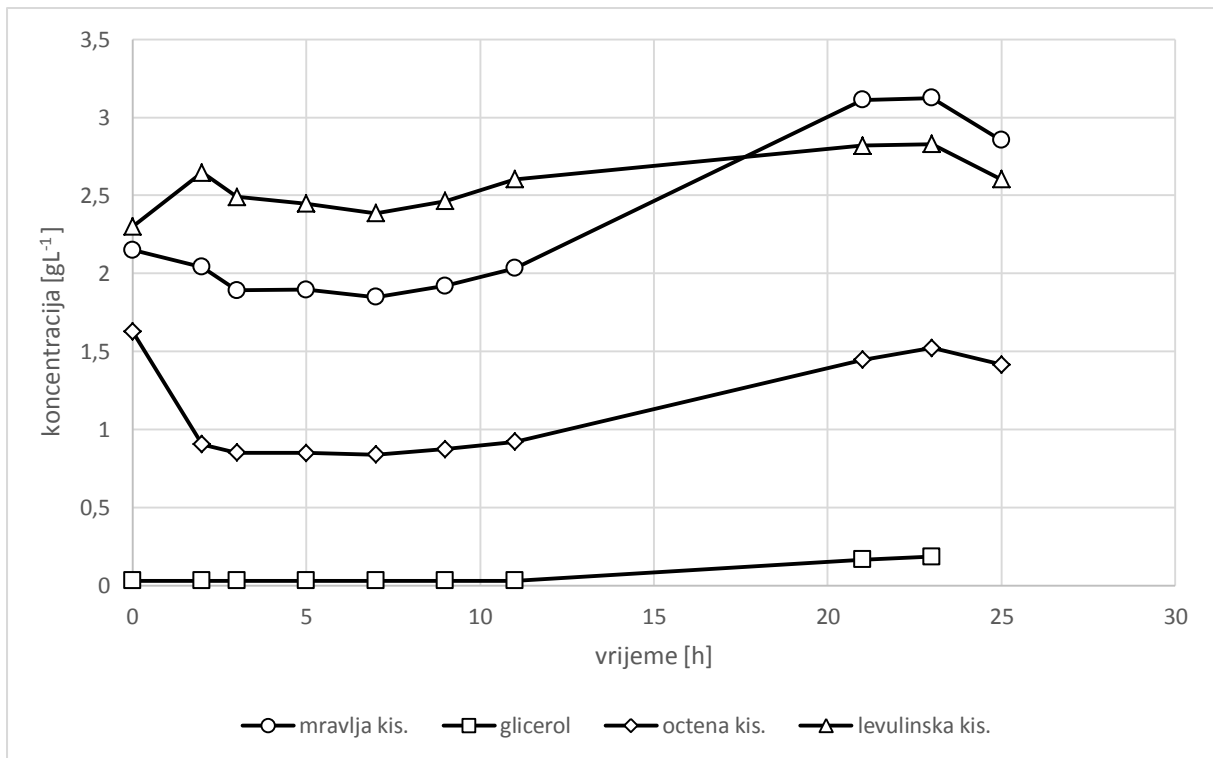
Da bi se potvrdili rezultati istraživanja u Erlenmeyer tikvicama, anaerobni uzgoj kvasca *S.cerevisiae* proveden je u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB). HRCB je konstruiran za uzgoj na polučvrstim (ili čvrstim) supstratima kao što su bile hranjive podloge koje su sadržavale hidrolizate lignoceluloznih sirovina. HRCB se u ovom istraživanju intervalno rotirao (12 minuta rotacija od 10 min^{-1} i 48 minuta mirovanje), a korisni volumen bioreaktora iznosio je 5 L. Prethodno navedeno u skladu je s rezultatima prethodnih istraživanja (Pavlečić, 2013.).

4.3.1. Anaerobni uzgoj kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatima pšenične slame

Rezultati uzgoja kvasca na polučvrstoj podlozi koja je sadržavala hidrolizat pšenične slame prikazani su na slici 25 (a,b).



Slika 25a. Promjene koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze i etanola tijekom uzgoja kvasca u HRCB na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame



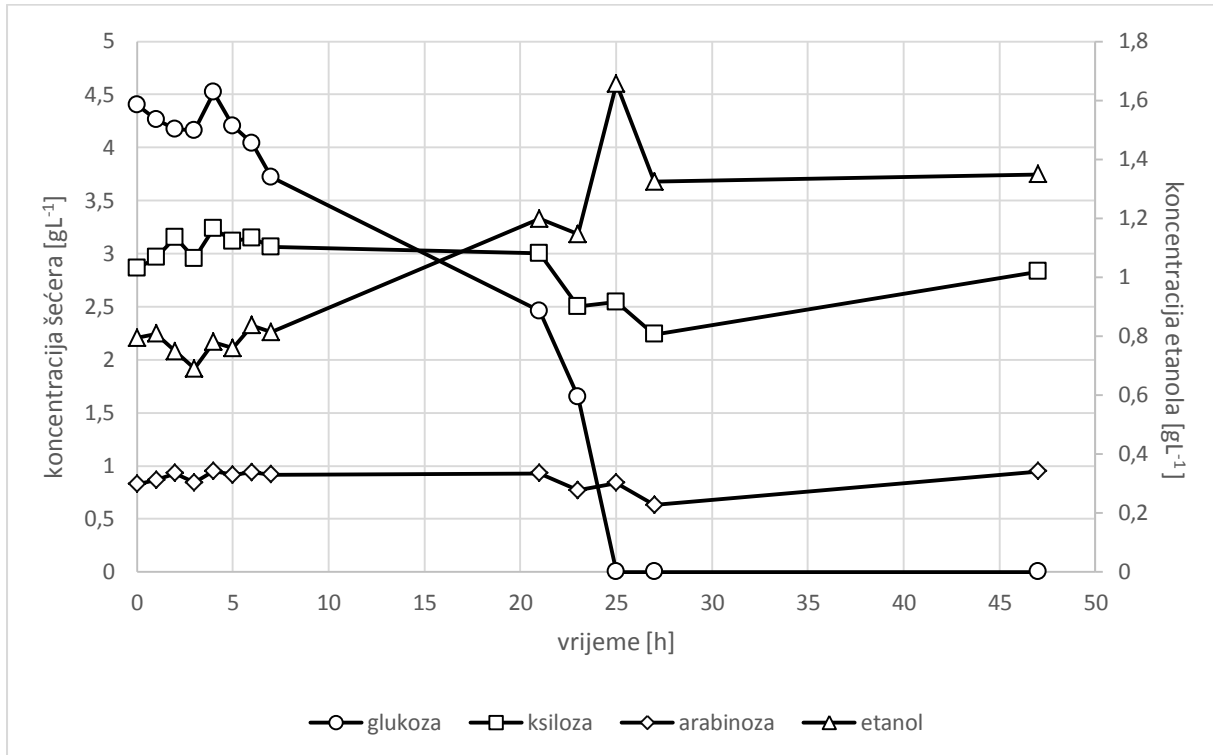
Slika 25b. Promjene koncentracije mravlje, octene i levulinske kiseline odnosno glicerola na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame tijekom uzgoja kvasca u HRCB

Iz prikazanih rezultata (slika 25a) vidljivo je da je potpuna potrošnja glukoze registrirana u 25 sati uzgoja. Koncentracije ksiloze i arabinoze su gotovo nepromijenjene, što je u skladu s očekivanjima budući da *Saccharomyces cerevisiae* ne fermentira pentoze, što je u skladu s literaturom (van Maris i sur., 2006). Maksimalna koncentracija etanola od $2,3 \text{ g L}^{-1}$ uz neznatne koncentracije glicerola zabilježena je na kraju uzgoja. Tijekom ovog istraživanja praćene su i promjene koncentracije mravlje, octene i levulinske kiseline koje su produkti hidrolize lignoceluloznih sirovina (slika 25b). Koncentracije navedenih kiselina su se i tijekom uzgoja su neznatno povećale kao posljedica aktivnosti kvasca, ali i mogućih analitičkih grešaka.

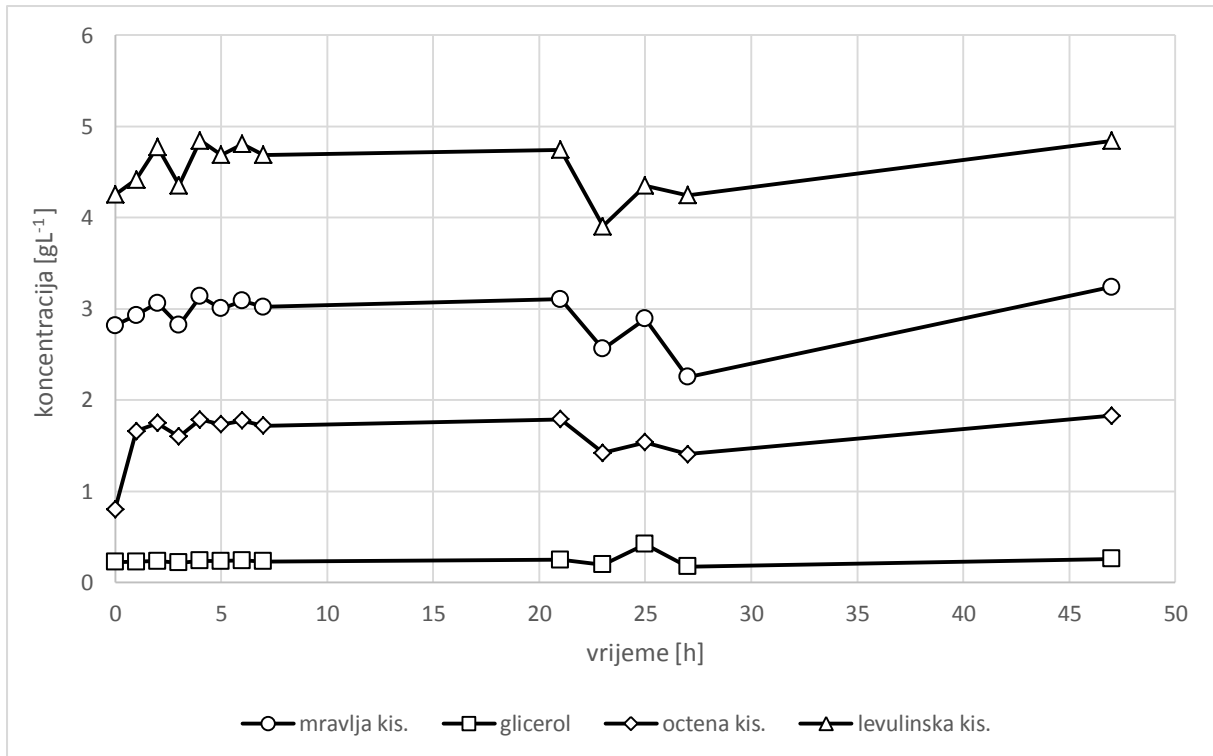
Tijekom anaerobnog uzgoja kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame praćen je i broj stanica kvasca standardnim mikrobiološkim analizama. Međutim, zbog analitičke pogreške dobiveni rezultati nisu reprezentativni, te nisu razmotreni.

4.3.2. Anerobni uzgoj kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruzovine

Rezultati anaerobnog uzgoja kvasca *S.cerevisiae* na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruzovine u HRCB-u prikazani su na slikama 26 (a,b) i 26.

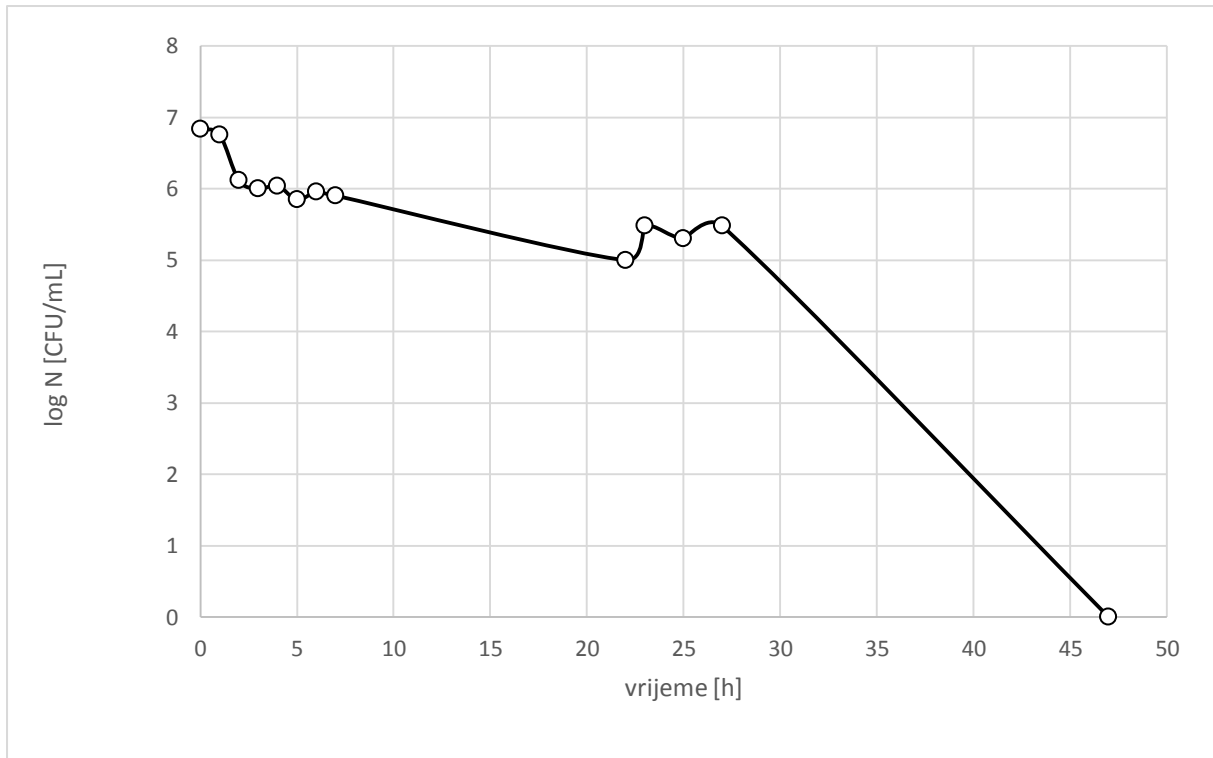


Slika 26a. Promjene koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze i etanola tijekom uzgoja kvasca u HRCB na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruzovine



Slika 26b. Promjene koncentracije mravlje, octene i levulinske kiseline odnosno glicerola tijekom uzgoja kvasca u HRCB na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruzovine

Iz dobivenih rezultata (slika 26 a i b), vidljiva je slična dinamika odvijanja bioprocesa kao i kod anaerobnog uzgoja kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame. Glukoza je kao i kod prethodnog eksperimenta potrošena nakon 25 sati uzgoja.

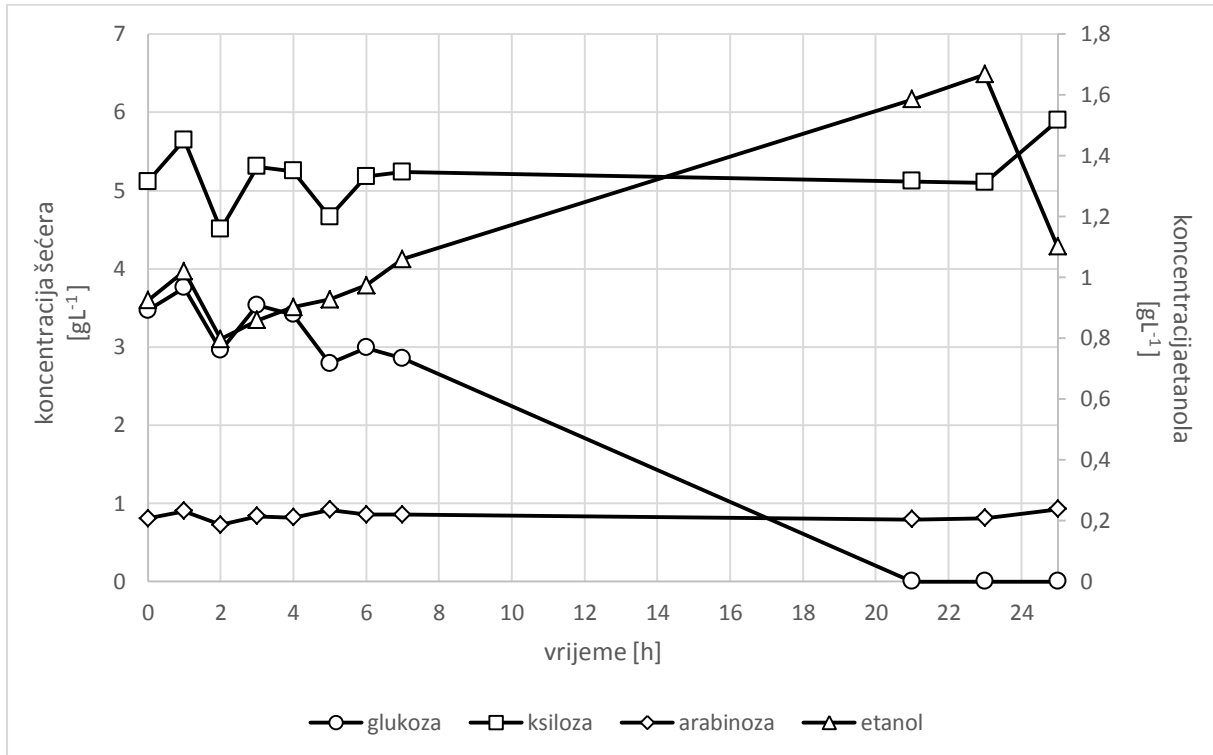


Slika 27. Promjena broja stanica kvasca (log N) tijekom uzgoja na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruzovine u HRCB

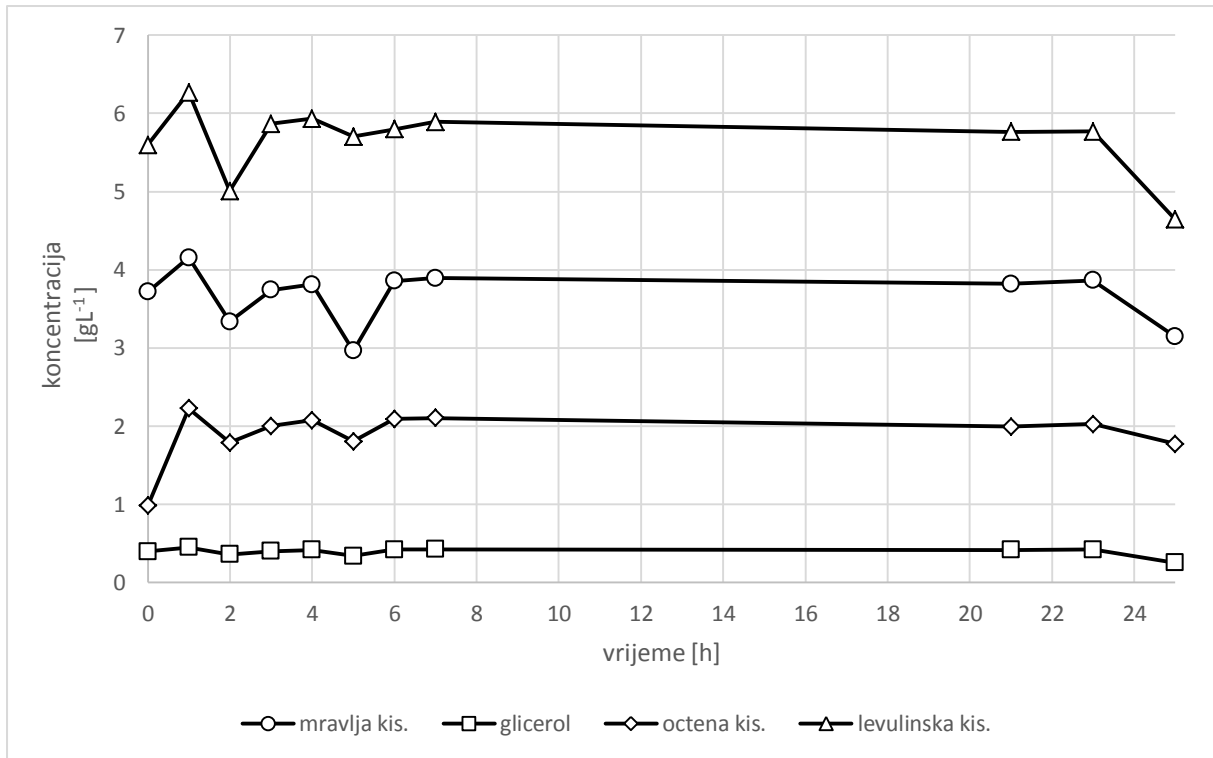
Iz prikazanih rezultata na slici 27 vidljivo je signifikantno smanjenje broja stanica kvasca tijekom prvih nekoliko sati anerobnog uzgoja na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruzovine. Navedena pojava najvjerojatnije je posljedica prisutnosti sastojaka hidrolizata kukuruzovine u hranjivoj podlozi koji inaktiviraju stanice kvasca a time utječu i na dinamiku odvijanja bioprocasa.

4.3.3. Anaerobni uzgoj kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruznih oklasaka

Rezultati anaerobnog uzgoja kvasca *S.cerevisiae* na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruznih oklasaka prikazani su slikama 28 (a, b) i 29.

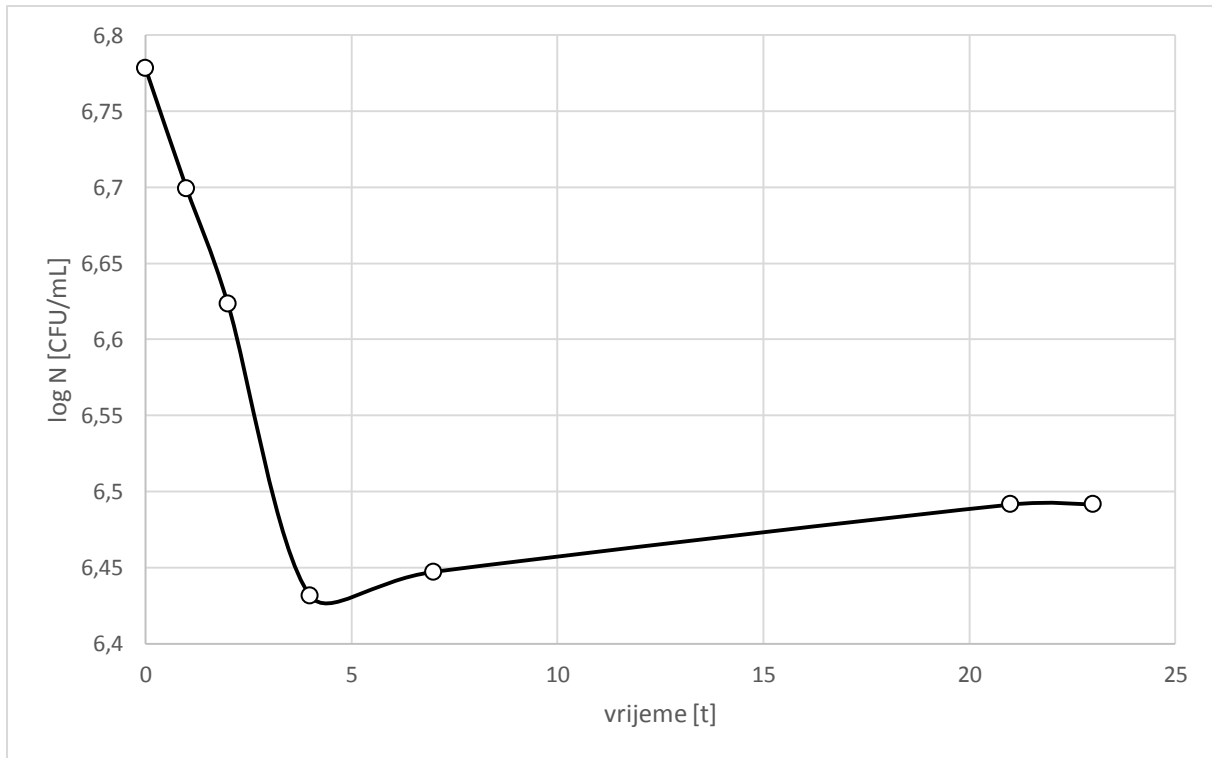


Slika 28a. Promjene koncentracije glukoze, ksiloze, arabinoze i etanola na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruznih oklasaka tijekom uzgoja kvasca u HRCB



Slika 28b. Promjene koncentracije mravlje, octene i levulinske kiseline odnosno glicerola na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukruznih oklasaka tijekom uzgoja kvasca u HRCB

Iz prikazanih rezultata na slici 28 (a,b) vidljiv je sličan trend promjena nadziranih parametara bioprocasa kao i kod anaerobnog uzgoja kvasca na hranjivoj podlozi s ostala dva hidrolizata lignoceluloznih sirovina (slike 25 i 26).



Slika 29. Promjene broj stanica kvasca (log N) na hranjivoj podlozi s hidrolizatom kukuruznih oklasaka tijekom uzgoja kvasca u HRCB

Na slici 29 vidljivo je smanjenje broja stanica tijekom prvih nekoliko sati uzgoja kao posljedica djelovanja sastojaka hidrolizata lignoceluloznih oklasaka na stanice kvasca, ali u odnosu na hidrolizat kukuruzovine to smanjenje nije bilo toliko značajno što je rezultiralo dobivanjem najveće koncentracije etanola nakon 20 sati anaerobnog uzgoja (slika 28a).

U hidrolizatima lignoceluloznih sirovina koji su služili kao hranjiva podloga za uzgoj kvasca u HRCB, nalaze se, uz furfural, octenu, mravlju i levulinsku kiselinu, i ostali spojevi koji nisu analitički detektirani. Sinergističko inhibitorno djelovanje tih spojeva na enzime kvasca utjecalo je na proizvodnju etanola i rast kvasca. Nadalje, hidrolizati lignoceluloznih sirovina sadrže i suspendirane tvari koje također utječu na koncentraciju etanola odnosno biomase kvasca.

Tablica 8. Pokazatelji uspješnosti anaerobnog uzgoja kvasca *S.cerevisiae* na hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina

Hranjiva podloga s hidrolizatom lignoceluloznih sirovina	ΔS [gL ⁻¹]	Yp [gL ⁻¹]	Yp/s [gg ⁻¹]	Pr [gL ⁻¹ h ⁻¹]	E [%]
Pšenična slama	7,221	1,560	0,216	0,0678	42
Kukuruzovina	4,402	0,862	0,195	0,0330	38
Kukuruzni oklasci	3,469	0,661	0,190	0,0314	37

Iz podataka prikazanih u tablici 8, vidljivo je da su najveće vrijednosti pokazatelja uspješnosti anaerobnog uzgoja *S.cerevisiae* na hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina zabilježene kod uzgoja na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame. Međutim, potrebno je istaknuti da je neophodno daljnje optimiranje postupaka predobrade lignoceluloznih sirovina kao i odabir novog soja radnog mikroorganizma koji će biti u stanju koristiti pentoze u svrhu povećanja učinkovitosti bioprocasa.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata ovog istraživanja izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Termalni postupak (210 °C; 20 bar; 1% H₂SO₄; 5 min) predobrade lignoceluloznih sirovina (pšenična slama, kukuruzovina i kukuruzni oklasci) povezan je s proizvodnjom inhibitora rasta (mravlje, octene i levulinske kiseline, furfurala itd.) kvasca *S.cerevisiae* i proizvodnje etanola.
2. Istraživanje utjecaja furfurala na rast kvasca *S.cerevisiae* i proizvodnju etanola u koncentracijskom intervalu od 0-5 gL⁻¹ furfurala u hranjivoj podlozi pokazuje da koncentracije furfurala veće od 0,5 gL⁻¹ signifikantno utječu na rast kvasca i proizvodnju etanola.
3. Anaerobni uzgoj kvasca *S.cerevisiae* na hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina u Erlenmeyer tikvicama pokazuje sposobnost kvasca da metabolizira određene sastojke takve hranjive podloge odnosno da raste na podlogama s relativno velikim koncentracijama inhibitora.
4. Anerobni uzgoj kvasca *S.cerevisiae* na polučvrstim hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina pokazuje da su najveće vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocasa zabilježene tijekom uzgoja kvasca na hranjivoj podlozi s hidrolizatom pšenične slame. U tom uzgoju zabilježene su ove vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocasa: $Y_{p/s} = 0,261 \text{ gg}^{-1}$, $Pr = 0,0678 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ i $E = 42 \%$.
5. Unapređenje procesa proizvodnje etanola na hranjivim podlogama s hidrolizatima lignoceluloznih sirovina moguće je provesti kroz optimizaciju uvjeta provođenja bioprocasa u HRCB-u, uvjeta termalne predobrade lignoceluloznih sirovina i odabirom radnog mikroorganizma (genetički modificiranog kvasca ili bakterije) koji ima sposobnost korištenja pentoze odnosno visoku tolerantnost na inhibitore prisutne u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina.

6. LITERATURA

1. Mussatto S.I., Teixeira J.A., (2010) Lignocellulose as raw material in fermentation processes, *Formatex, Appl Microbiol Biotechnol*, 897-907
2. Baptista, A., Ferreira, I., Borges, J., (2013) Cellulose-based bioelectronic devices. U: Cellulose-medical, pharmaceutical and electronic application, (van de Ven T., Godbout L., ured.), (objavljeno online 29.kolovoza, 2013.), doi: 10.5772/56721
3. Chen, W., Zhong, L. X., Peng, X. W., Wang, K., Chen, Z. F., & Sun, R. C., (2014). Xylan-type hemicellulose supported palladium nanoparticles: a highly efficient and reusable catalyst for the carbon–carbon coupling reactions, *Catal Sci Technol*, **4**, 1426-1435.
4. Zakzeski J., Bruijninx P.C.A., Jongerius A.J., Weckhuysen B.M., (2009) The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals, (objavljeno online ožijakm 2010.) doi: 10.1021/cr900354u
5. Grabber J.H., (2005) How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies, *Crop Sci* **45**, 820–831.
6. Sun Y. I Cheng J., (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour Technol* **83**, 1-11.
7. Parawira W, Tekere M., (2011) Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review, *Crit Rev Biotechnol* **31**, 20–31.
8. Lonsane B.K., Saucedo-Castaneda G., Raimbault M., Roussos S., Viniegra-Gonzalez G., Ghildyal N.P., Ramakrishna M., Krishnaiah M.M., (1992) Scale-sp strategies for solid state fermentation systems, *Process Biochem* **27**, 259-273.
9. Perez J., Munoz-Dorado J., de la Rubia T., Martinez J., (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview, *Int Microbiol* **5**, 53–63.

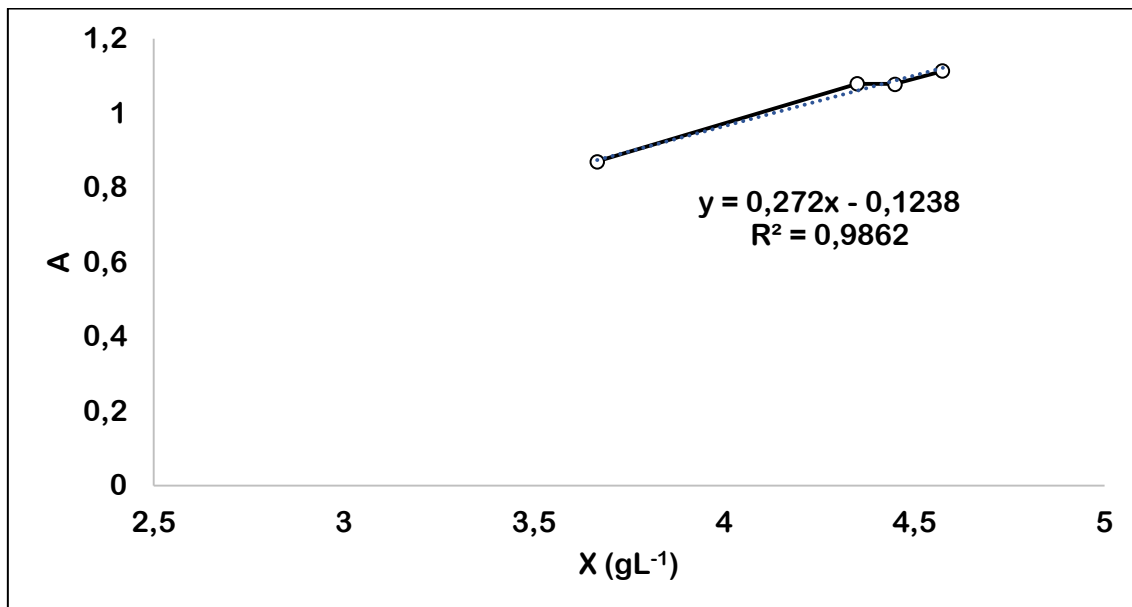
10. Hamelick C. N., van Hooijdonk G. i Faaji A. P.C., (2005) Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term, *Biomass Bioenergy*, **28**, 384-410.
11. Yang B., Wyman E. C., (2008) Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol, *Biofuel Bioprod Bior* **2**, 26-40.
12. Rowell R. M., Pettersen R., Tshabalala M.A., (2005) Cell wall chemistry. U: Handbook of wood chemistry and wood composites, drugo izdanje, Taylor & Francis Group , London, New York, str. 35-74
13. Sjostrom E., (1993) Wood polysaccharides. U: Wood chemistry: Fundamentals and applications, drugo izdanje, Elsevier, Amsterdam, str. 54-70
14. Fengel D. i Wegener G., (1984) Wood –chemistry, ultrastructure, reactions (Belgacem M. N., Gandini A., ured.), Elsevier , Amsterdam, str. 289-300
15. Hendriks A. T. W .M. , Zeeman G., (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresour Technol* **100**, 10–18.
16. Kumar P., Barrelet M. D., Delwiche J. Michael, Stroeve P., (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production, *Ind. Eng. Chem. Res.* (objavljeno online 20.ožujka 2009) doi: 10.1021/ie801542g
17. Alvira P., Tomas-Pejo E., Ballesteros M., Negro M.J., (2009) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresour Technol* **101**, 4851-61
18. Mosier N. i sur. (2005) Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover, *Bioresour Technol* **96**, 1986- 1993.
19. Silverstein i sur., (2008) A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks, *Bioresour Technol* **98**, 3000-11.

20. Taherzadeh M., Karimi K.,(2007) Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review, *BioResources* **2**, 472-99.
21. Garcia-Aparicio Prado M., Ballesteros I., Gonzalez A., Oliva J. M., Ballesteros M., Negro J., (2006) Effect of Inhibitors Released During Steam-Explosion Pretreatment of Barley Straw on Enzymatic Hydrolysis, *Appl Biochem Biotechnol* Vol. 129–132.
22. Zheng Y., Pan Z., Zhang R., (2009) Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production, *Int J Agric & Biol Eng* **2(3)**, 51-68
23. Galbe M. i Zacchi G., (2002) A review of the production of ethanol from softwood, *Appl Microbiol Biotechnol.* **59**, 618-628.
24. Demirbas A.,(2008) The importance of bioethanol and biodiesel from biomass, *Energ Source* **3**, 177-85.
25. Yu Y., Lou X., Wu H., (2008) Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods, *Energy Fuels* **22**, 46-60.
26. Saha i sur., (2005) Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol, *Process Biochem.* **40**, 3693-3700.
27. Harmsen P., Lips S., Bakker R., (2013) Pretreatment of lignocellulose for biotechnological production of lactic acid, *Food and Biobased research*, 5-19.
28. Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B.K., (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 10-26.

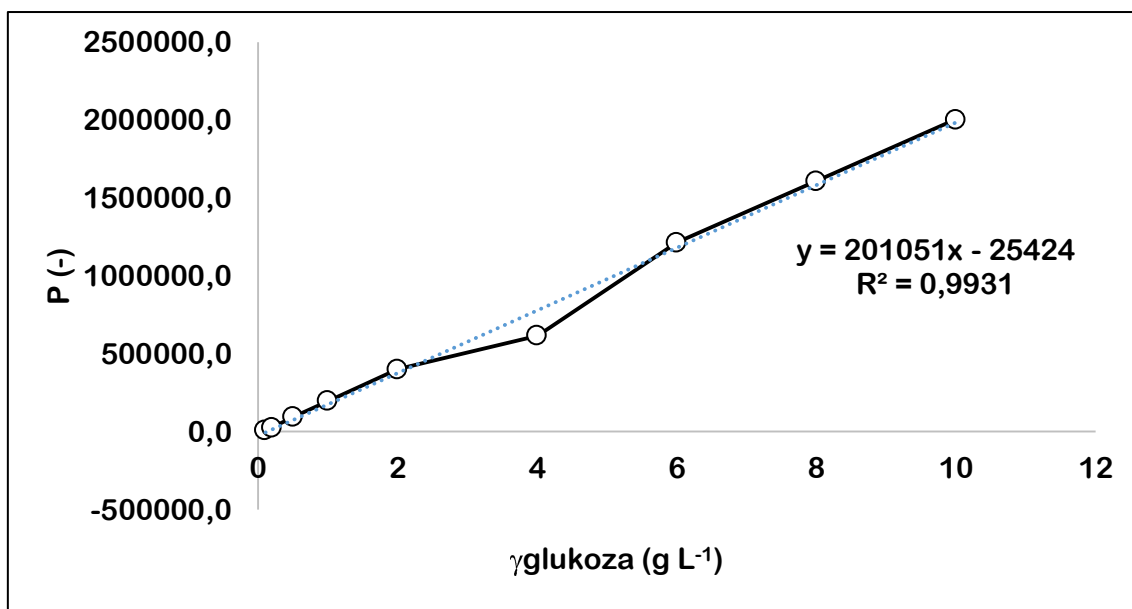
29. Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition, *Bioresour Technol* **74**, 25-33.
30. Modig T., Liden G., Taherzadeh M. J., (2002) Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase, *Biochem. J.* **363**, 769-776.
31. Pavlečić M. (2013) Proizvodnja etanola na različitim međuproduktima šećerne repe i matematičko modeliranje tih procesa. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
32. Olofsson K., Bertilsson M., Liden G., (2008) A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks (objavljeno online 1.svibnja, 2008.) doi:10.1186/1754-6834-1-7.
33. van Maris A.J.A, Abbott D.A., Bellissimi E., van den Brink J., Kuyper M., Luttik M.A.H., Wisselink W.H., Scheffers W.A., van Dijken J.P., Pronk J.T.,(2006) Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status, *Antonie van Leeuwenhoek* **90**, 391–418.
34. Olsson L., Hanh- Hägerdal B., (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 312-331.
35. Zeng, A.P., Deckwer W.D., (1995) A kinetic model for substrate and energy consumption of microbial growth under substrate-sufficient conditions, *Biotechnol. Prog.* **11**, 71-79
36. Sluiter J.B., Ruiz R.O., Scarlata C.J., Sluiter A.D., Templeton D.W., (2010) Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods, *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9043–9053

7. PRILOG 1

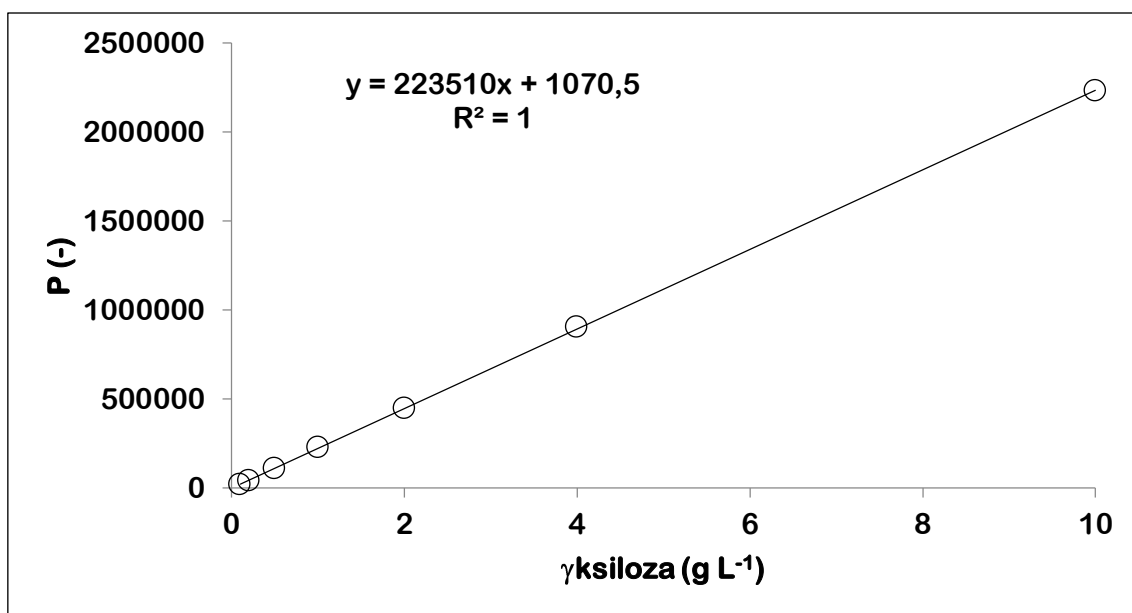
U ovom poglavlju prikazani su baždarni dijagrami



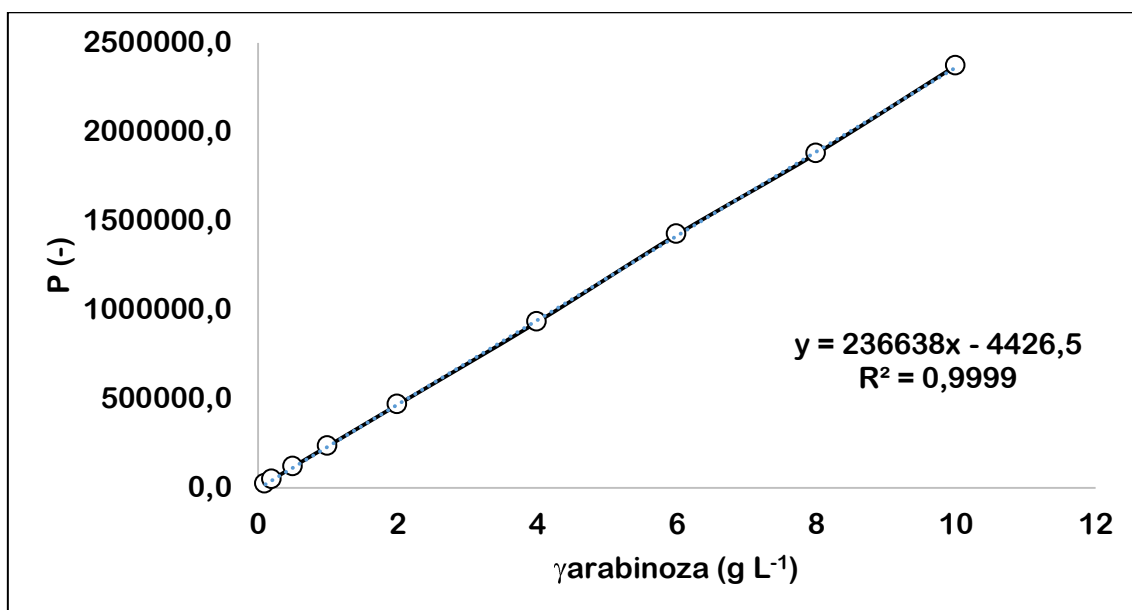
Slika 30. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji biomase



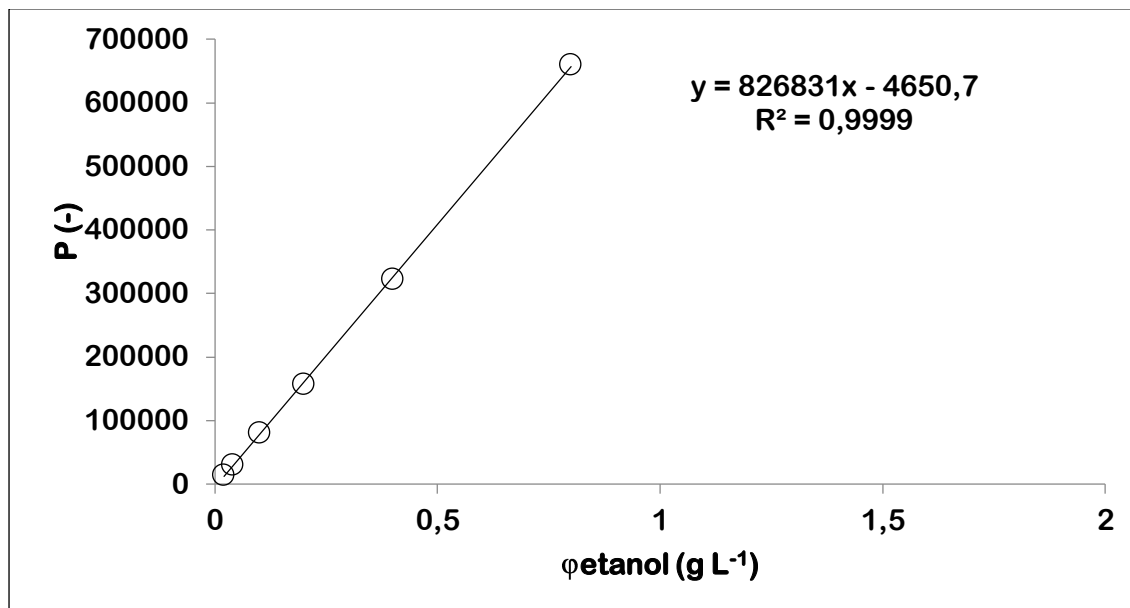
Slika 31. Baždarni dijagram ovisnosti površine o koncentraciji glukoze



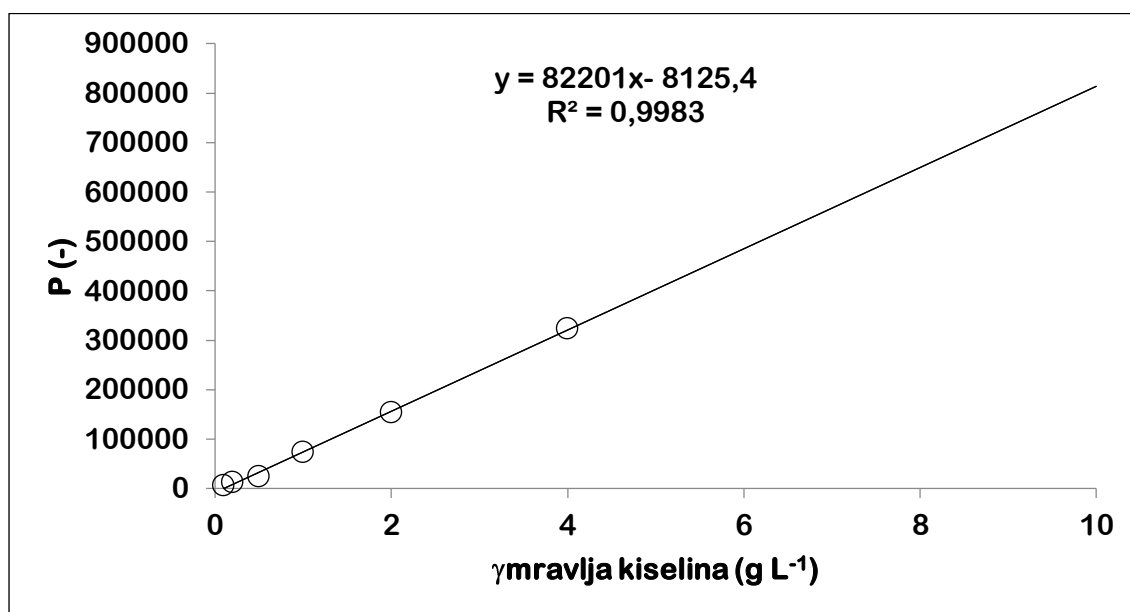
Slika 32. Baždarni dijagram ovisnosti površine o koncentraciji ksiloze



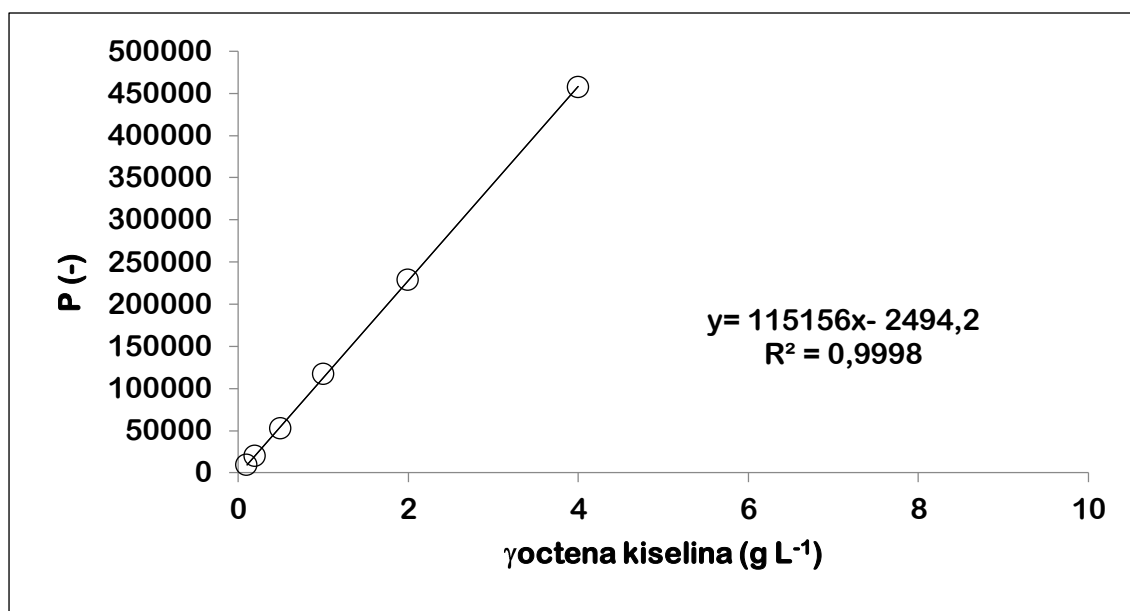
Slika 33. Baždarni dijagram ovisnosti površine o koncentraciji arabinoze



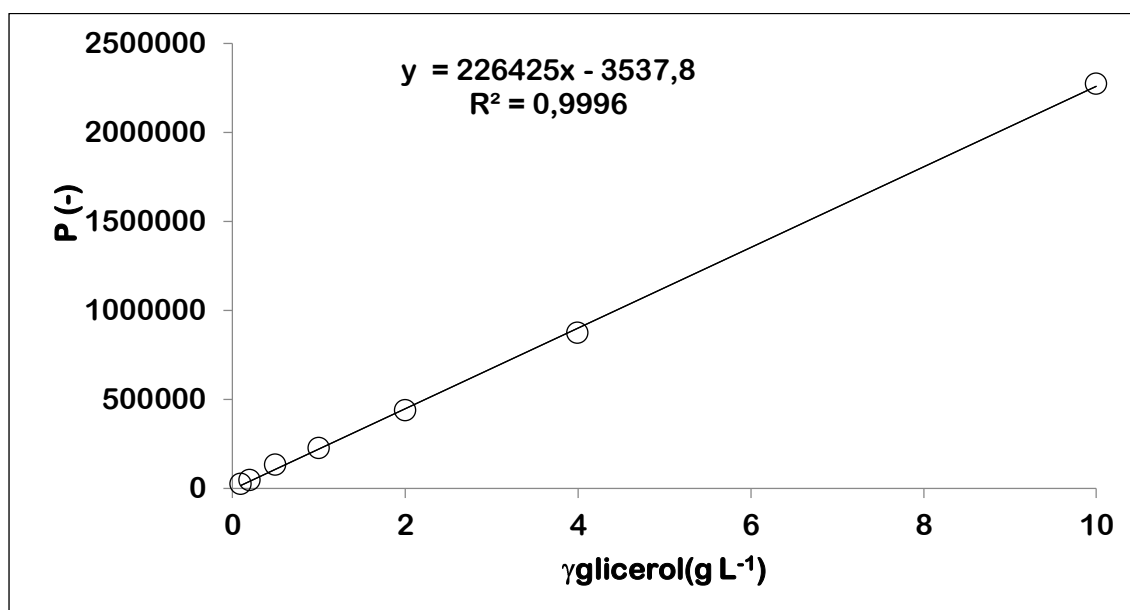
Slika 34. Baždarni dijagram ovisnosti površine o koncentraciji etanola



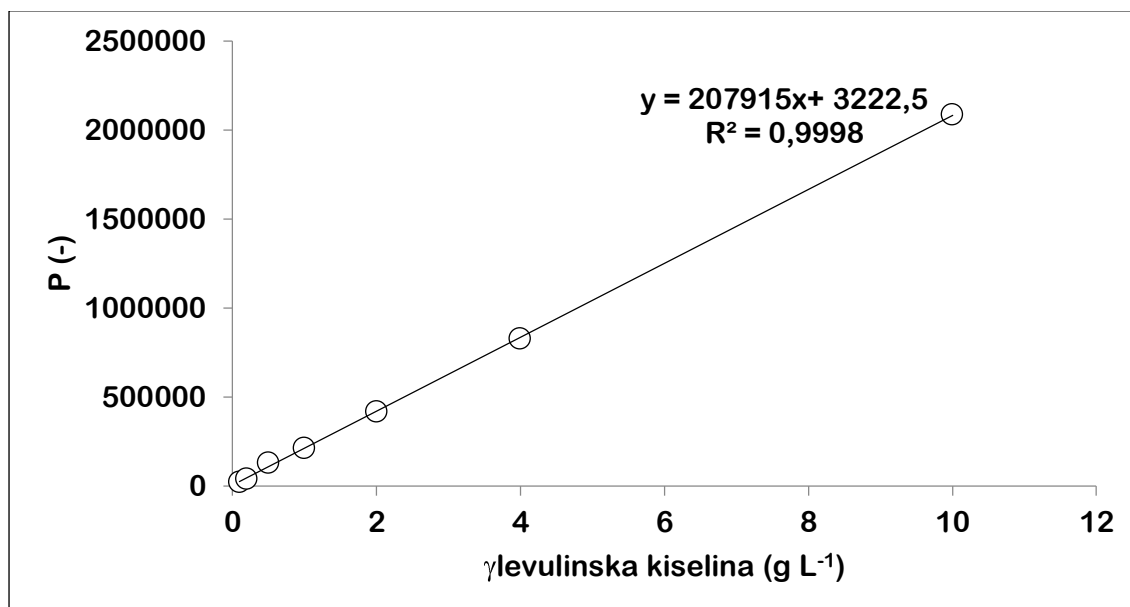
Slika 35. Baždarni dijagram ovisnosti površine o koncentraciji mravlje kiseline



Slika 36. Baždarni dijagram ovisnosti površine o koncentraciji octene kiseline



Slika 37. Baždarni dijagram ovisnosti površine o koncentraciji glicerola



Slika 38. Baždarni dijagram ovisnosti površine o koncentraciji levulinske kiseline