

# Predobrada kukuruznih oklasaka za proizvodnju bioetanola

---

**Govedarica, Darija**

**Undergraduate thesis / Završni 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:159:763888>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Darija Govedarica**  
**6597/BT**

**PREDOBRADA KUKURUZNIH OKLASAKA ZA  
PROIZVODNJU BIOETANOLA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul: Biokemijsko inženjerstvo**  
**Mentor: prof. dr.sc. Božidar Šantek**

**Zagreb, 2016.**

Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta „Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina” (HRZZ-9158) pod vodstvom prof. dr. sc. B. Šanteka.

Najljepše se zahvaljujem sljedećim osobama:

- Svojem mentoru prof. dr. sc. Božidaru Šanteku (Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu) na predloženoj temi i pomoći pri izradi završnog rada
- dr. sc. Antoniji Trontel i dr.sc. Mariju Novaku (Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu) na pruženoj stručnoj pomoći i savjetima te za uloženi trud i strpljenje
- Igoru Livada, tehničkom suradniku Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu na stručnoj pomoći, dobroj volji i ugodnoj radnoj atmosferi
- kolegama Franu Ivančiću, Anji Lauder i dipl. ing. biotech. Alenu Kostiću na suradnji, savjetima te ugodnom društvu jer su učinili vrijeme provedeno u izradi rada zanimljivijim i ljepšim.

# DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

## PREDOBRADA KUKURUZHNIH OKLASAKA ZA PROIZVODNJU BIOETANOLA

*Darija Govedarica, 6597/BT*

### **Sažetak:**

Lignocelulozne sirovine su jeftine i obnovljive sirovine za proizvodnju biogoriva no, zbog svoje kompleksne strukture moraju biti podvrgnute predobradi, te daljnjoj hidrolizi polisaharida u fermentabilne ugljikohidrate. Kukuruzni oklasci, korišteni u ovom radu, usitnjeni su mljevenjem i provedena je predobrada u visokotlačnom reaktoru uz različite koncentracije sumporne kiseline ( $w = 0,5\%$  i  $1,0\%$ ) kao katalizatora. Postupak predobrade proveden je pri  $210^{\circ}\text{C}$  i tlaku pare od 20 bara pri različitim vremenima zadržavanja od 1 do 10 minuta. Nakon postupka predobrade kukuruznih oklasaka, dobiveni hidrolizat se sastoji od dvije faze, tekuće i čvrste faze. Svaka faza je zasebno analizirana te je određen sastav i koncentracija polimera, odnosno fermentabilnih ugljikohidrata, lignina topivog u kiselini, lignina netopivog u kiselini i nusproizvoda (octena kiselina, levulinska kiselina, mravlja kiselina, furani). Navedeni nusproizvodi mogu imati inhibitorski učinak na rast mikroorganizama. Tijekom postupka predobrade kukuruznih oklasaka pri temperaturi od  $210^{\circ}\text{C}$ , tlaku pare od 20 bara i vremenu zadržavanja od 5 minuta uz  $1,0\%$  sumpornu kiselinu kao katalizator proizvedeno je najviše fermentabilnih ugljikohidrata u hidrolizatu kukuruznih oklasaka, dok je najmanje inhibirajućih spojeva proizvedeno tijekom postupka predobrade pri temperaturi od  $210^{\circ}\text{C}$ , tlaku pare od 20 bara i vremenu zadržavanja od 5 minuta uz  $0,5\%$  sumpornu kiselinu kao katalizator.

**Ključne riječi:** kukuruzni oklasci, predobrada u visokotlačnom reaktoru, kiselinska hidroliza, HPLC

**Rad sadrži:** 41 stranica, 14 slika, 4 tablice, 65 literaturna navoda, 8 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (word format) obliku pohranjen u:** Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr.sc. Božidar Šantek

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Antonija Trontel

**Rad predan:** rujan, 2016

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Undergraduate studies Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Brewing

### PRETREATMENT OF CORN COBS FOR BIOETHANOL PRODUCTION

*Darija Govedarica, 6597/BT*

#### **Abstract:**

Lignocellulose raw materials are low-cost and renewable materials for production of biofuels. Due to its complex structure, lignocellulose must be subjected to different pretreatment methods and subsequently to further hydrolysis of polysaccharides to fermentable monosaccharides. Corn cobs, used in this work, were milled and resulting material was pretreated in high pressure reactor with dilute sulphuric acid ( $w = 0,5 \%$  and  $1,0 \%$ ). Pretreatment was performed at  $210^{\circ}\text{C}$ , 20 bar vapor pressure at different holding times, from 1 to 10 minutes. After the pretreatment obtained hydrolysate consisted of two phases, liquid and solid phase. Each phase was analyzed separately, and composition of polymers, fermentable carbohydrates, acid soluble lignin, acid insoluble lignin and different byproducts (acetic acid, levulinic acid, formic acid and furans). These byproducts can have inhibitory effect on growth of microorganisms.

Highest concentrations of fermentable carbohydrates in hydrolysates of corn cobs were achieved after pretreatment of corn cobs at  $210^{\circ}\text{C}$ , vapor pressure of 20 bars, 5 minutes hold time and  $1,0 \%$  sulfuric acid. The lowest amount of inhibiting compounds was produced after pretreatment of corn cobs at  $210^{\circ}\text{C}$ , vapor pressure 20 bars, 5 minutes hold time and  $0,5 \%$  sulfuric acid.

**Keywords:** corn cobs, pretreatment in high pressure reactor, acid hydrolysis, HPLC

**Thesis contains:** 41 pages, 14 figures, 4 tables, 65 references, 8 supplements

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (word 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:** PhD Antonija Trontel

**Thesis delivered:** September, 2016.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Lignocelulozne sirovine .....	2
2.1.1 Sastav lignoceluloze .....	3
2.1.2. Kukuruzni oklasci.....	5
2.2. Predobrada lignocelulozne sirovine.....	6
2.2.1. Metode predobrade.....	6
2.2.2. Kemijska predobrada- kiselinska hidroliza .....	7
2.2.3. Predobrada parom uz brzu dekompresiju .....	8
2.2.4. Predobrada vrućom vodom.....	8
2.2.5. Predobrada vodenom parom.....	9
2.2.6. Nusproizvodi koji nastaju tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina .....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	12
3.1. MATERIJALI .....	12
3.1.1. Sirovine .....	12
3.1.2. Kemikalije .....	13
3.1.3. Aparatura i pribor .....	13
3.1.3.1. Mlin čekičar.....	13
3.1.3.2. Visokotlačni reaktor za predobradu lignocelulozne sirovine.....	14
3.1.3.3. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti .....	15
3.1.3.4. Ostala oprema.....	16
3.2. METODE RADA .....	16
3.2.1. Priprema sirovine.....	16
3.2.2. Predobrada vodenom parom u visokotlačnom reaktoru .....	16
3.2.3. Analitičke metode.....	18
3.2.3.1. Određivanje udjela suhe tvari .....	19
3.2.3.2. Određivanje udjela lignina topivog u kiselini u čvrstoj fazi hidrolizata kukuruznih oklasaka .....	19
3.2.3.3. Dvostupanjska kiselinska hidroliza lignoceluloznih sirovina .....	19
3.2.3.4. Određivanje furfurala u tekućoj fazi hidrolizata kukuruznih oklasaka .....	20
3.2.4. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).....	20
3.2.4.1. Priprema uzoraka čvrste faze hidrolizata za HPLC analizu.....	20
3.2.4.2. Priprema uzorka tekuće faze hidrolizata za HPLC analizu.....	21
3.2.4.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	21
3.2.4.4. Izrada baždarnog pravca za određivanje koncentracije ugljikohidratnih jedinica .....	22
4. REZULTATI.....	23
4.1. Analiza sastava lignocelulozne sirovine – kukuruznog oklasaka .....	24
4.2. Određivanje sastava tekuće faze hidrolizata kukuruznih oklasaka.....	25
4.3. Određivanje sastava čvrste faze hidrolizata kukuruznih oklasaka.....	27
5. RASPRAVA.....	28
5.1. Analiza sastava lignocelulozne sirovine – kukuruznog oklasaka .....	28

5.2. Određivanje sastava tekuće faze hidrolizata kukuruznih oklasaka .....	28
5.3. Određivanje sastava čvrste faze hidrolizata kukuruznih oklasaka .....	30
6. ZAKLJUČAK .....	31
7. LITERATURA .....	32
8. PRILOZI .....	38
8.1. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracija ugljikohidrata .....	38
8.2. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracija nusproizvoda .....	40



## **1. UVOD**

## 1. UVOD

Cijena proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznog materijala je relativno visoka s obzirom na trenutačnu tehnologiju, stoga je glavni izazov reducirati troškove proizvodnje i povećati prinos etanola. Konverzija uključuje dva procesa: hidrolizu celuloze u fermentabilne šećere i fermentaciju jednostavnih ugljikohidrata u etanol (Duff i Murray, 1996). Celuloza je nedostupna celulolitičkim enzimima, zbog prisutnosti lignina i hemiceluloze, stoga je potrebno prethodno provesti delignifikaciju i uklanjanje hemiceluloze da bi se poboljšala učinkovitost procesa hidrolize, a posljedica toga je redukcija kristalčnosti celuloze i povećanje poroznosti materijala (McMillan, 1994).

Kriteriji koje predobrada mora ispuniti su: povećanje koncentracije fermentabilnih šećera, smanjeno nastajanje toksičnih nusproizvoda koji mogu djelovati inhibitorno na proces hidrolize i fermentacije, smanjena degradacija ili gubitak ugljikohidrata i ekonomičnost metode (Dale i sur., 1984; Wright, 1998). Veliki naponi su uloženi u unapređenje procesa predobrade lignoceluloznih sirovina jer se posljedično može unaprijediti daljnja biotehnoška proizvodnja biogoriva poput bioetanola, ali i brojnih biokemikalija s ciljem redukcije proizvodnje istih u petrokemijskoj industriji (Azzam, 1989; Cadoche i Lopez, 1989; Reshamwala i sur., 1995; Bjerre i sur., 1996)

Cilj ovog rada bio je provesti predobradu kukuruznog oklasaka u visokotlačnom reaktoru uz sumpornu kiselinu kao katalizator i optimirati proces predobrade ove lignocelulozne sirovine. Nakon predobrade kukuruznih oklasaka određen je sastav dviju dobivenih faza, tekuće i čvrste faze. Osim koncentracije strukturnih ugljikohidrata, lignina topivog i netopivog u kiselini, određene su i koncentracije toksičnih spojeva (furfural, hidroksimetilfurfural, octena kiselina, levulinska kiselina i mravlja kiselina) koji mogu nastati tijekom postupka predobrade.

## **2. TEORIJSKI DIO**

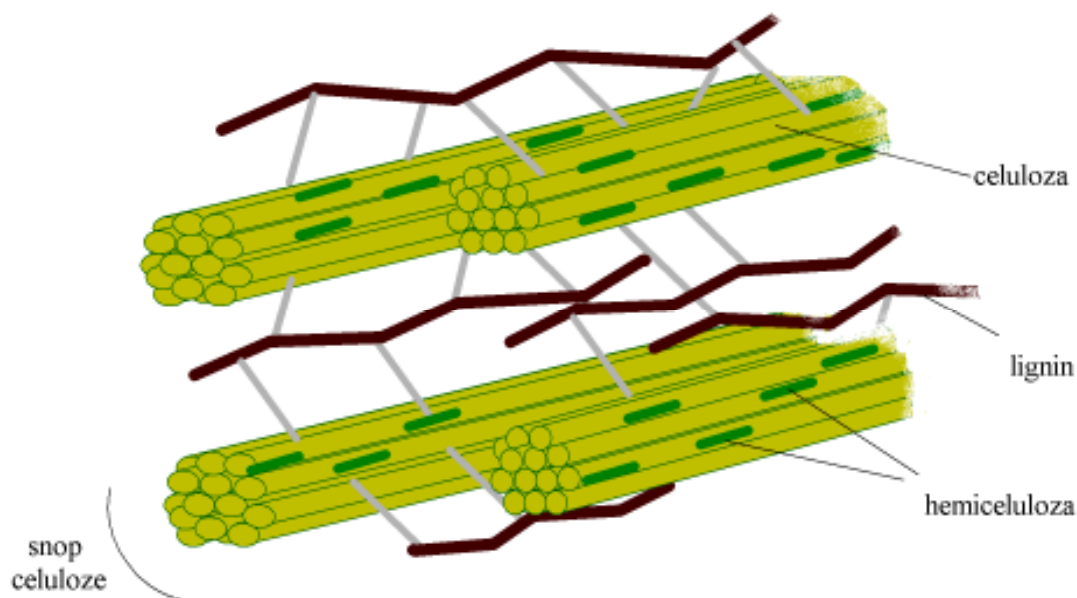
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Lignocelulozne sirovine

Lignocelulozna biomasa je najobilnija biomasa, koja zauzima skoro 70% ukupne biomase iz biljaka sa godišnjom proizvodnjom od oko  $200 \times 10^9$  tona (Percival-Zhang, 2008). Velike količine lignocelulozne biomase dobiju se kao nusproizvod nakon žetve različitih poljoprivrednih kultura (npr. kukuruza, slame, šećerne repe, trava; Anwar i sur., 2014). Osim toga, izvori lignoceluloznih sirovina su ostaci iz drvne industrije (npr. piljevina, lišće, ostaci drva; Palonen, 2004) i industrije proizvodnje i prerade papira (npr. sulfitna lužina; Saini i sur., 2015).

Stoga bi se velike količine lignoceluloznih sirovina mogle koristiti kao jeftin izvor ugljikohidrata za proizvodnju biogoriva, biokemikalija i enzima različitim biotehnološkim postupcima (Anwar i sur., 2014).

Lignocelulozna sirovina ima složenu strukturu koju čine tri polisaharida: hemiceluloza (25-30%), celuloza (40-50%) i lignin (15-20%; Gray i sur., 2006) Udio tih spojeva ovisi o podrijetlu biomase.



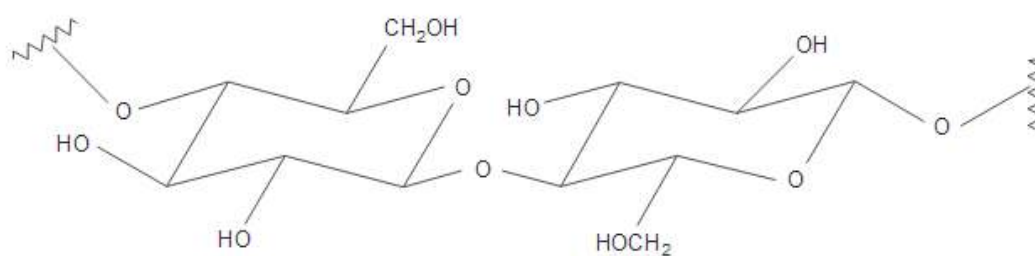
**Slika 1.** Shematski prikaz strukture lignoceluloze (prilagođeno iz Anonimus 1.).

### 2.1.1 Sastav lignoceluloze

Celuloza, lignin i hemiceluloza ugrađeni su u kompleksni matriks koji je jako otporan na enzimsku degradaciju (Mosier i sur., 2005).

Celuloza se sastoji od D-glukočnih podjedinica koje su povezane sa 1,4-glikozidnom vezom (Fengel i Wegener, 1984). Duljina lanca celuloze značajno varira ovisno o stupnju polimerizacije koji dostiže. U određenim molekulama može iznositi 9000–10 000, a u nekim sirovinama i do 15 000 glukočnih jedinica (Rowell i sur., 2005). To je najzastupljeniji ravnolančani polisaharid koji čini glavnu komponentu biljnih staničnih stijenki tako što su molekule celuloze povezane nekovalentnim vezama (vodikovim vezama) tvoreći celulozne fibrile upakirane u celulozne snopove koje strukturi posljedično daju dodatnu čvrstoću i stabilnost (Laureano-Perez i sur., 2005).

Iako se najveći dio celuloze u lignocelulozi nalazi u kristaličnom obliku, mali udio celuloze je amorfne strukture koja je dostupna djelovanju celulaza (Sjostrom, 1993).

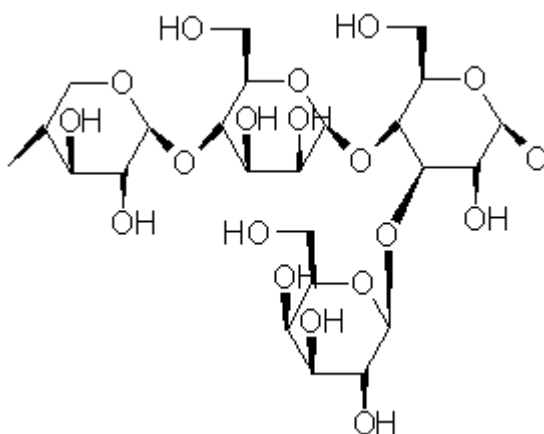


**Slika 2.** Strukturna jedinica celuloze (O'Sullivan, 1997)

Hemiceluloza je razgranati heteropolimer (polisaharid) koji je građen od pentoza (arabinoze i ksiloze), heksoza (manoze, glukoze i galaktoze) i kiselina (glukuronska i galakturonska kiselina; Timell, 1967). Dominantna komponenta hemiceluloze u poljoprivrednim biljkama i drveću je ksilan (Saha, 2003). Hemiceluloza služi kao poveznica između lignina i celuloznih vlakana i daje cijeloj toj mreži krutost (Laureano-Perez i sur., 2005).

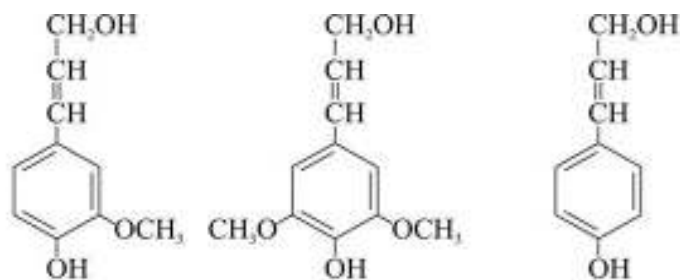
S obzirom da sadrži veliki udio amorfne strukture građene od različitih ugljikohidrata, hemiceluloza ima bolju topivost u vodi i lakše se razgrađuje od celuloze, jer je najosjetljivija na termički ili kemijski predtretman, u odnosu na celulozu i lignin (Levan i sur., 1990; Winandy, 1995). Također, hemiceluloza ima manju molekulsku masu od celuloze i grane sa

kraćim bočnim lancima koje se sastoje od različitih ugljikohidrata koji se jednostavnije hidroliziraju (Fengel i Wegener, 1984).



**Slika 3.** Struktura hemiceluloze (preuzeto iz Anonimus 2).

Lignin je, uz celulozu, najzastupljeniji složeni amorfni polimer u prirodi i prisutan je u staničnoj stjenki biljaka. Građen je od tri različite fenilpropanske jedinice: p-kumaril, koniferil i sinapil alkohol koje su međusobno povezane različitim vezama i o njihovom udjelu i uređenosti unutar strukture lignin ovisi njegova topivost u kiselini, neutralnom mediju ili lužini (Grabber, 2005). Strukturne jedinice od kojih je građen prikazane su na slici 4.



koniferil alkohol

sinapil alkohol

p-kumaril alkohol

**Slika 4.** Građevne jedinice lignina (Freudenburg i sur., 1968).

Najvažnije uloge lignina su da daje strukturalnu čvrstoću biljkama, omogućava nepropusnost stanične stijenke i rezistenciju prema napadima patogenih mikroorganizama i oksidativnom stresu. Nije topiv u vodi i optički je inaktivan što čini njegovu degradaciju vrlo kompliciranom (Fengel i Wegener, 1984). Njegova razgradnja započinje slično kao kod hemiceluloze pri temperaturi od 180 °C (Bobleter, 1994).

Komponente lignocelulozne biomase koje su manje zastupljene su proteini, pepeo, organske kiseline, pektin, spojevi s dušikom i drugi spojevi koji ne izgrađuju osnovnu strukturu biomase. Pod pojmom pepeo smatrao se bilo koja anorganska materija, u pravilu je to silicij (Sluiter i sur., 2013). Obično se određuje prije i nakon određivanja ekstraktivnih tvari budući da se dio anorganskih soli može otopiti tijekom ekstrakcije (Hames, 2009). Ekstraktivne tvari su kompleksne smjese koje se u biljnoj stanici nalaze u malim koncentracijama (smole, steroli, tanini, terpeni, kinoni, flavonidi itd.). Proteini su kompleksne polimerne strukture koje se sastoje od lanaca aminokiselina i u biomasama različitog podrijetla se javljaju u različitim oblicima (Hames, 2009; Sluiter i sur., 2013).

### **2.1.2. Kukuruzni oklasci**

Kukuruzni oklasak je poljoprivredni nusproizvod koji se dobije nakon berbe kukuruza (Pointner i sur., 2014). Osim oklaska, kao nusproizvod berbe kukuruza, dobije se stabljika, list i komušina. Udio u masi oklaska u odnosu na dozrjelu biljku kukuruza u vrijeme berbe iznosi oko 8 %. Ako se masa zrnja kukuruza ne uzme u izračun, udio mase oklaska u kukuruzovini iznosi oko 15 % (Pordesimo i sur., 2005).

Danas se kukuruzni oklasci uglavnom spaljuju u energetskim postrojenjima (Pointner i sur., 2014). Kao obnovljivi materijal, oklasci su jedna od glavnih potencijalnih sirovina koja se koristi u proizvodnji bioplina, biodizela i bioetanola (Ioannidou i sur., 2009) i drugih biokemikalija (Rezić, 2012). Kukuruzni oklasci u prosjeku sadrže 45% celuloze, 35% hemiceluloze i 15% lignina (Reshamwala i sur., 1995). Međutim, prije nego što se može iskoristiti kao sirovina za fermentacijske procese, potrebno je predobraditi sirovinu da bi povećali pristup enzimskoj razgradnji (Zimbardi i sur., 2002).

## **2.2. Predobrada lignocelulozne sirovine**

### **2.2.1. Metode predobrade**

Lignocelulozni materijali, zbog svoje kompleksne strukture moraju biti podvrgnuti postupku predobrade prije enzimske hidrolize i mikrobnе fermentacije. Predobrada sirovina je potrebna kako bi se promijenio sastav i struktura sirovina s ciljem izdvajanja lignina, efikasne enzimske hidrolize u sljedećem koraku (osigurava se dostupnost lignoceluloze hemicelulazama i celuloze celulazama), brze fermentacije (bez inhibicije), smanjenja troškova zbrinjavanja otpada i smanjenja energetske troškova za miješanje i izdvajanje proizvoda (Rezić, 2012). Metode predobrade se dijele na fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke (Kumar i sur., 2009).

Fizikalne metode osiguravaju povećanje pora i površine lignocelulozne sirovine, smanjenje kristalčnosti celuloze i djelomičnu ili potpunu hidrolizu hemiceluloze. Uključuju mehaničko usitnjavanje (mljevenje, drobljenje), tretman parom ili SO<sub>2</sub>, ekstruziju, pirolizu, ekspanziju i zračenje  $\gamma$ -zrakama. Nedostaci fizikalne predobrade su slabo izdvajanje lignina i veliki utrošak energije (Alviera i sur., 2009).

Kemijske metode obuhvaćaju tretiranje sirovine kiselinama i/ ili lužinama, organskim otapalima, ionskim tekućinama ili procesom ozonolize. Na taj način se osigurava povećanje površine i pora lignocelulozne sirovine, smanjenje stupnja polimerizacije, djelomičnu ili potpunu hidrolizu hemiceluloze i djelomično izdvajanje lignina (delignifikaciju). Prednost kemijske metode je efikasnost predobrade, a nedostaci su korištenje agresivnih kemikalija, potreba za procesnom opremom otpornom na njihovo djelovanje te potreba za zbrinjavanjem takvih kemikalija. Najčešće se koriste klorovodična, dušična, fosfatna i sumporna kiselina, a od lužina se upotrebljavaju amonijak i natrijev hidroksid (Rezić, 2012).

Fizikalno-kemijska predobrada ima jednake učinke kao i kemijske metode predobrade. Obuhvaćaju predtretman sirovine toplom vodom i eksploziju vodenom parom, amonijakom ili ugljikovim dioksidom. Osiguravaju delignifikaciju, smanjenje stupnja polimerizacije i djelomičnu hidrolizu celuloze. Najvažniji nedostaci ove metode su mali prinos glukoze i relativno nizak stupanj hidrolize hemiceluloze, a prednosti su mali energetske troškovi i velika efikasnost hidrolize te odsustvo agresivnih kemikalija i smanjena sinteza inhibitornih molekula (Y. Sun i J. Cheng, 2002).



Biološke metode predobrade obuhvaćaju korištenje mikroorganizama i njihovih enzima za razgradnju lignina i hidrolizu hemiceluloze. Najčešće se koriste saprofitne gljive, plijesan, ali i bakterije (Fan i sur., 1987). Osiguravaju djelomičnu hidrolizu celuloze, smanjenje stupnja polimerizacije i delignifikaciju. Prednosti ove metode su jednostavnost postupka, efikasnost hidrolize celuloze celolitičkim enzimima koja je ireverzibilna, mali utrošak energije i odsustvo korištenja agresivnih kemikalija. Glavni nedostaci biološke predobrade su visoka cijena, mali prinos i duže trajanje procesa u odnosu na ostale metode zbog toga što se radi sa živim stanicama koje mogu biti osjetljive na derivate lignina (Sun i Cheng, 2002).

### **2.2.2. Kemijska predobrada- kiselinska hidroliza**

Tretman kiselinom uključuje korištenje sulfatne, nitratne ili neke druge mineralne kiseline za uklanjanje komponenata hemiceluloze i izlaganje celuloze enzimskoj hidrolizi (Silverstein, 2008).

Kemijski postupak kiselinske hidrolize obuhvaća podvrgavanje lignocelulozne sirovine niskom tlaku i temperaturi prilikom koje dolazi do hidrolize hemiceluloze i celuloze na jednostavne ugljikohidrate i potrebno je postići velike prinose ugljikohidrata da bi se smatrala učinkovitom metodom (Sivers i Zacchi, 1994). Postoje dva osnovna tipa procesa kiselinske hidrolize: hidroliza razrijeđenom kiselinom i hidroliza koncentriranom kiselinom.

Predtretman 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; Taherzadeh, 2008). Hidroliza razrijeđenom kiselinom je uspješno razvijena za predobradu lignoceluloznih sirovina. Koriste se 0,5-1,5 % kiseline u temperaturnom intervalu od 121 °C do 160 °C.

Uspoređujući s predtretmanom koncentriranim kiselinama, ovaj postupak daje manje inhibitora koji nastaju razgradnjom ugljikohidrata, ali i uzrokuje manje probleme s korozijom. Tretmani koncentriranom kiselinom se provode sumpornom kiselinom (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) koja je najčešće korištena uz ostale mineralne kiseline (HCl, HNO<sub>3</sub>) u rasponu koncentracije od 10-30 %. Ovakav postupak osigurava potpunu i djelotvornu konverziju celuloze u glukozu i hemiceluloze u pentozne šećere (Demirbas, 2008). Prepreke u postizanju ekonomičnosti procesa su korozija, visoka cijena kiseline i reciklacija pa ih to čini ekonomski neisplativima u odnosu na fizikalno-kemijske metode zbog potrebe za skupljom opremom koja je otporna

na korozivno djelovanje kiseline, neutralizacijom pH-vrijednosti nakon postupka hidrolize (Rezić, 2012).

### **2.2.3. Predobrada parom uz brzu dekompresiju**

Najčešće korištena metoda za predobradu lignoceluloznih sirovina (McMillan, 1994). U ovoj metodi se usitnjena biomasa tretira sa vodenom parom pod izrazito visokim tlakom nakon čega se tlak naglo smanji što uzrokuje eksplozivnu dekompresiju lignoceluloznog materijala (eng. steam explosion). Takva predobrada se najčešće inicira pri temperaturama od 160-260 °C što odgovara tlaku od 0,69-4,83 MPa i traje od nekoliko sekundi do par minuta prije nego što se materijal izloži atmosferskom tlaku. Proces uzrokuje degradaciju hemiceluloze i transformaciju lignina (delignifikaciju) što povećava potencijal hidrolize celuloze. Optimalna učinkovitost hidrolize hemiceluloze se postiže visokom temperaturom u kratkom vremenu ili nižom temperaturom s dužim vremenom zadržavanja (Duff i Murray, 1996). Faktori koji utječu na predobradu vodenom parom uz brzu dekompresiju su vrijeme zadržavanja, temperatura (također i tlak), veličina usitnjene sirovine i udio vode u sirovini. Dodatkom H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se može: efektivno poboljšati daljnja enzimaska hidroliza, smanjiti produkcija inhibitornih spojeva i potpuno ukloniti hemiceluloza (Morjanoff i Gray, 1987). Negativna strana ove metode je što uključuje destrukciju dijela frakcije ksilana, nepotpuna razgradnja lignina – karbohidratnog matriksa i sinteza spojeva koji mogu djelovati inhibitory na mikroorganizme koji se koriste u daljnjim bioprocima (Mackie i sur., 1985).

### **2.2.4. Predobrada vrućom vodom**

Termička predobrada lignocelulozne sirovine u kojoj se koristi vruća voda umjesto vodene pare (eng. liquid hot water). Cilj metode je da vruća voda otopi glavninu hemiceluloze te na taj način poveća pristupačnost enzimima koji razgrađuju celulozu i smanji, odnosno onemogućiti nastajanje inhibitornih molekula (Weil i sur., 1997). Da bi se to postiglo, potrebno je održavati pH vrijednost između 4,0-7,0 tijekom predobrade. Na taj način se postiže smanjeno nastajanje monosaharida i produkata razgradnje koji dalje kataliziraju hidrolizu lignocelulozne biomase (Kohlmann i sur., 1995; Mosier i sur., 2005). Razlika između predobrade vrućom vodom i vodenom parom je koncentracija otopljenih produkata razgradnje

koja je veća pri predobradi vrućom vodom u usporedbi s predobradom vodenom parom i ne provodi se uz dodatak katalizatora (Bobleter, 1994). Velika prednost ove metode je da su otopljeni lignin i hemiceluloza prisutni u manjoj koncentraciji zbog većeg unosa vode u sustav za takvu vrstu predobrade i zbog toga je koncentracija produkata poput furfurala manja, a aglomeracija i taloženje lignina reducirano (Hendricks i Zeeman, 2009).

### **2.2.5. Predobrada vodenom parom**

Najbolja predobrada je ostvarena kombinacijom fizikalnih i kemijskih metoda, pa je tako i predobrada parom bez brze dekompresije (eksplozije) jedna od najuspješnijih metoda za predobradu lignocelulozne sirovine (Ramos, 2003). Cilj te metode je otvoriti strukturu hemiceluloze i time omogućiti bolju pristupačnost hidrolitičkim enzimima i izbjeći formiranje inhibitornih spojeva. Tijekom predobrade, biomasa se stavlja u veliki reaktor i podvrgava se visokoj temperaturi i tlaku na nekoliko minuta te se vodena para polako otpušta (nema brze dekompresije materijala) i biomasa se lagano hladi. Tijekom predobrade vodenom parom, dijelovi hemiceluloze se hidroliziraju i tvore kiseline koje mogu katalizirati daljnju hidrolizu hemiceluloze no, sam proces se najčešće provodi uz dodatak sulfatne kiseline kao katalizatora hidrolize te se provodi pri različitim parametrima procesa poput vremena zadržavanja, tlaka pare, temperature pare i koncentracije kiseline. Jedan od najvažnijih faktora koji utječu na potrebno vrijeme zadržavanja, a samim time i na učinkovitost procesa je udio vode u samoj sirovini jer što je on veći potrebno je duže vrijeme zadržavanja za zadovoljavajuću predobradu sirovine (Brownell i sur., 1986).

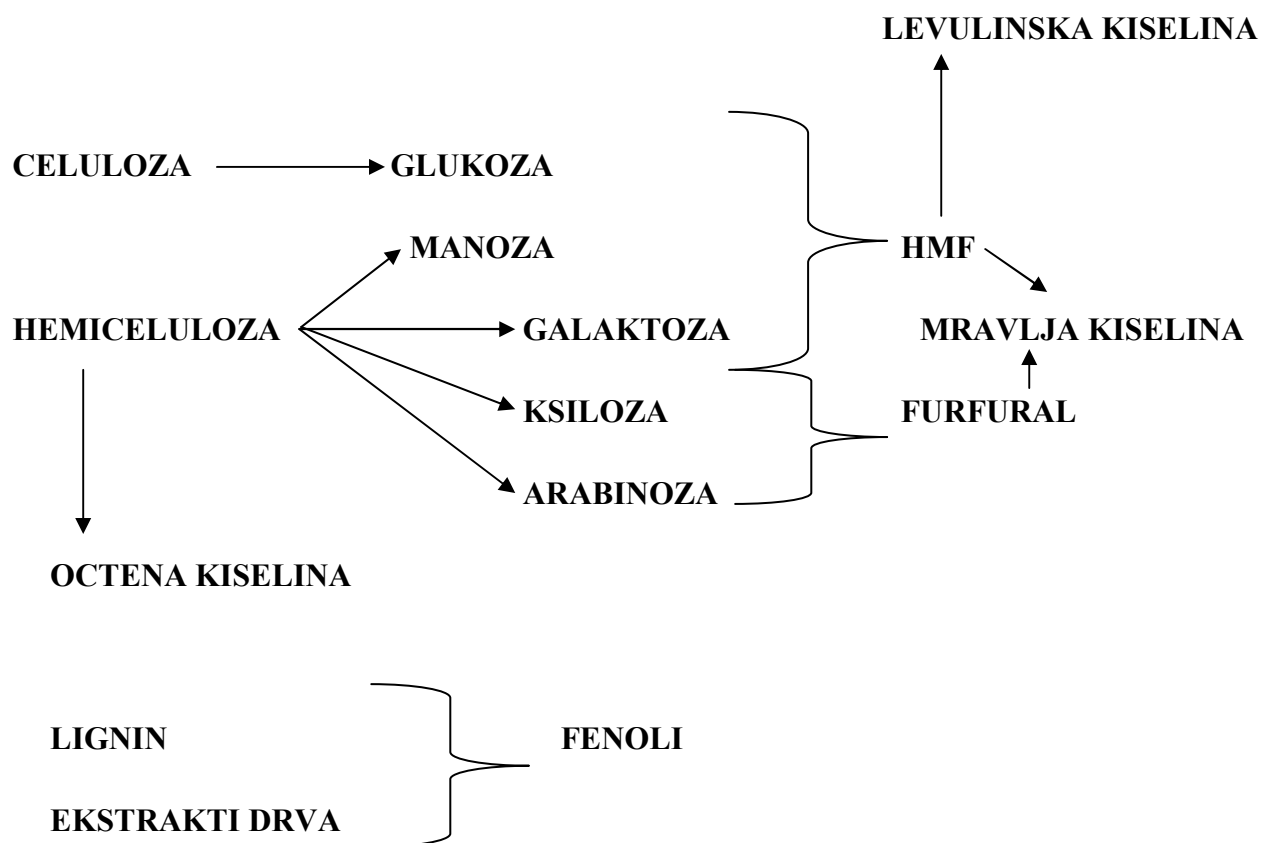
**Tablica 1.** Različiti tipovi procesa predobrade lignoceluloznih sirovina i parametri procesa

Metoda	Lignocelulozni materijal	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Reagens za impregnaciju	Referenca
<b>Predobrada parom, uz brzu dekompresiju</b>	Kukuruzni oklasci	205	8	H <sub>2</sub> O	Dottori i sur., 2013
	Kukuruzni oklasci	150	120	0,8 % (w/w) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Dottori i sur., 2013
	Kukuruzni oklasci	1. stupanj 150 2. stupanj 205	55 6,7	H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	Dottori i sur., 2013
	Kukuruzni oklasci	1. stupanj 150 2. stupanj 205	55 6,7	0,8 % (w/w) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	Dottori i sur., 2013
<b>Predobrada vodenom parom</b>	Slama	160 - 200	10 - 20	H <sub>2</sub> O	Eisenhuber i sur., 2013
<b>Predobrada vrućom vodom</b>	Slama	200	10	H <sub>2</sub> O	Hendricks i Zeeman, 2009
	Slama	280	15	H <sub>2</sub> O	Hendricks i Zeeman, 2009

### 2.2.6. Nusproizvodi koji nastaju tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina

Lignocelulozni hidrolizati sadrže alifatske kiseline poput octene kiseline, mravlje kiseline i levulinske kiseline (Jönsson i sur., 2013). Octena kiselina se formira primarno hidrolizom acetilnih skupina hemiceluloze dok mravlja i levulinska kiselina nastaju nakon kiselinom katalizirane termičke predobrade sirovine iz polisaharida. Mravlja kiselina je degradacijski produkt furfurala i 5-hidroksimetilfurfurala (HMF), a levulinska kiselina proizlazi iz razgradnje HMF. Furan aldehidi – furfural i HMF nastaju dehidratacijom pentoza i heksoza. Djeluju inhibitorno na rast mikroorganizama i na prinos konačnog proizvoda (npr. bioetanol) u daljnim biotehnološkim procesima. Navedeni nepoželjni spojevi se mogu

ukloniti prije fermentacije procesom detoksifikacije. Mogu se koristiti kemijske (precipitacija toksina i inhibitora nakon hidrolize, adsorpcija na aktivni ugljen) fizikalne (vakuum uparavanje jer uklanja hlapive komponente poput octene kiseline i furfurala) i biološke metode (tretmani enzimima i mikroorganizmima) za uklanjanje toksičnih spojeva (Rezić, 2012).



**Slika 5.** Formiranje nusprodukata tijekom razgradnje lignoceluloznih sirovina (Jönsson i sur., 2013).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Sirovine**

Lignocelulozna sirovina korištena za ovaj rad bili su kukuruzni oklasci. Potječe od soja kukuruza uzgojenom u okolici Ludbrega. Sirovina je usitnjena na mlinu čekičaru (poglavlje 3.1.3.1.). Tako usitnjena sirovina (Slika 6) je korištena u procesu predobrade u visokotlačnom reaktoru.



**Slika 6.** Kukuruzni oklasci usitnjeni na mlinu čekičaru.

### 3.1.2. Kemikalije

**Tablica 2.** Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripravu otopina.

<b>kemikalija</b>	<b>čistoća</b>	<b>proizvođač</b>
celobioza	p.a.	Molekula, UK
glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
ksiloza	≥99 %, za biokemiju	Roth, Njemačka
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
fosfatna kiselina	p.a., za HPLC	Fluka, Njemačka
kalcijev hidroksid	p.a.	Kemika, Hrvatska
sumporna kiselina	min. 96 %, p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcijev hidroksid	50 %, tehnički	Proizvodnja gašenog vapna, Hrvatska

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### 3.1.3.1. Mlin čekičar

Za usitnjavanje lignocelulozne sirovine korišten je mlin čekičar–tip NA45. Kapacitet mljevenja u zrnu iznosu 300 kg/h, a kapacitet mljevenja u klipu iznosi 250 kg/h. Ovaj mlin ima dvije vrste sita, veličine 12 mm i 5 mm. Za usitnjavanje kukuruznih oklasaka korišteno je sito veličine 5 mm

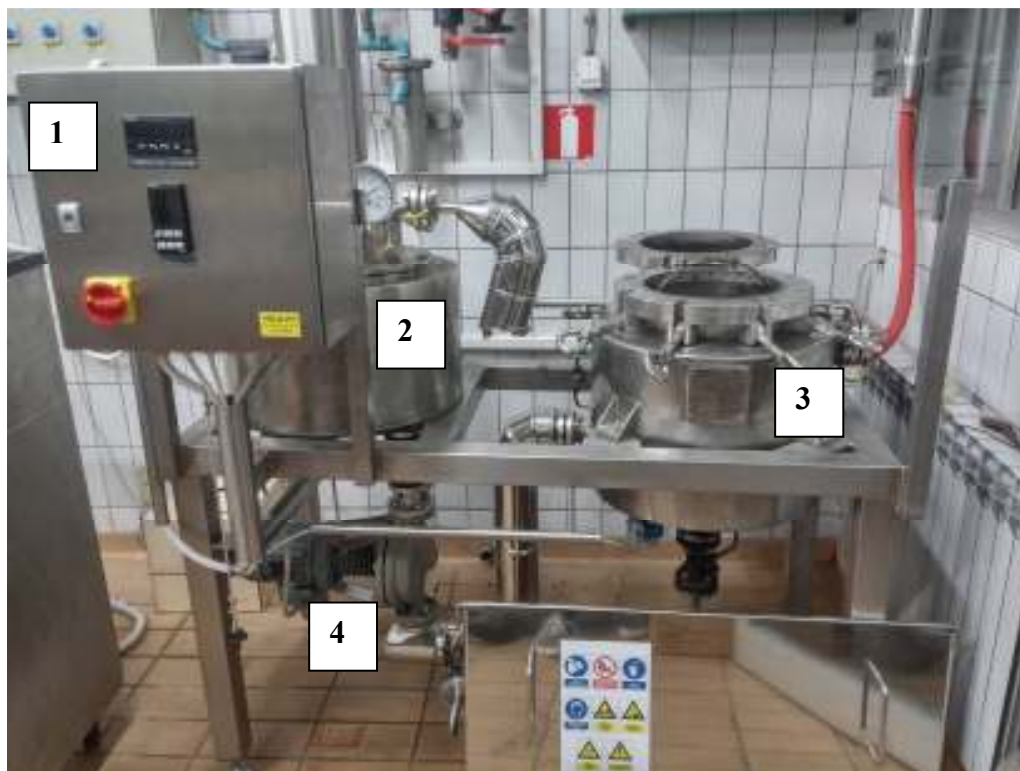




**Slika 7.** Mlin čekičar–tip NA45 (Megametal d.o.o., Nedelišće, Hrvatska)

### **3.1.3.2. Visokotlačni reaktor za predobradu lignocelulozne sirovine**

Sirovina se stavlja u metalnu poroznu košaru koja se nalazi u reaktoru zapremnine 20 litara, zatim se ulijeva 10 litara (L) razrijeđene kiseline ( $w = 0,5 \%$  ili  $1,0 \%$   $H_2SO_4$ ) i sadržaj se promiješa. Tada se reaktor zatvara i sustav se uključuje na kontrolnoj jedinici [1] čime započinje grijanje spremnika koji sadrži termičko ulje [2]. Reaktor za predobradu sirovine [3] se grije vrućim termičkim uljem preko plašta, a uključivanjem sustava uključuje se i pumpa koja omogućuje cirkulaciju termičkog ulja kroz cijeli sustav [4]. Nadzor procesa se vrši mjerenjem temperature ulja, temperature i tlaka u reaktoru sa sirovinom te temperature pare nastale tijekom zagrijavanja. Proces se vodi sve dok se ne postignu zadani uvjeti. Nakon završetka procesa se pomoću ventila sa gornje strane uređaja, koji služi za otpuštanje pare, spušta tlak na atmosferski, tekući dio se ispušta otvaranjem ventila na dnu reaktora (ispust), a kruti dio koji se nalazi u metalnoj košari se izvlači iz košare.



**Slika 8.** Visokotlačni reaktor za termičku predobradu lignoceluloznih sirovina

### **3.1.3.3. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti**

(eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)

Koncentracije celobioze, glukoze, arabinoze, ksiloze, octene, levulinske i mravlje kiseline te furana u izuzetim uzorcima određene su pomoću kromatografa Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan) Sustav se sastoji od crpke (LC-10AD<sub>VP</sub>), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10 AD<sub>VP</sub>), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A<sub>VP</sub>), ionsko-izmjenjivačke analitičke kolone (Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s predkolumnom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-19A<sub>VP</sub>) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).

### **3.1.3.4. Ostala oprema**

- analitička vaga Shimadzu (Kyoto, Japan);
- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- sušionik Instrumetarija ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- oprema za filtraciju otopina [najlonski filter (0,22 µm, 47 mm; Sartorius Stedim Biotech GMBH, Goettingen, Njemačka) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, SAD) ]
- ultrazvučna kupelj USC300T (VWR International, Leuven, Belgija)
- UV/Vis spektrofotometar Cary 13E Varian (Mulgrave, Australija)
- kvarčna kiveta promjera (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka)
- centrifuga Harrier 18/10 (Sanyo, Watford, Velika Britanija)
- hladnjak i zamrzivač (Gorenje, Slovenija)
- mlin za kavu

## **3.2. METODE RADA**

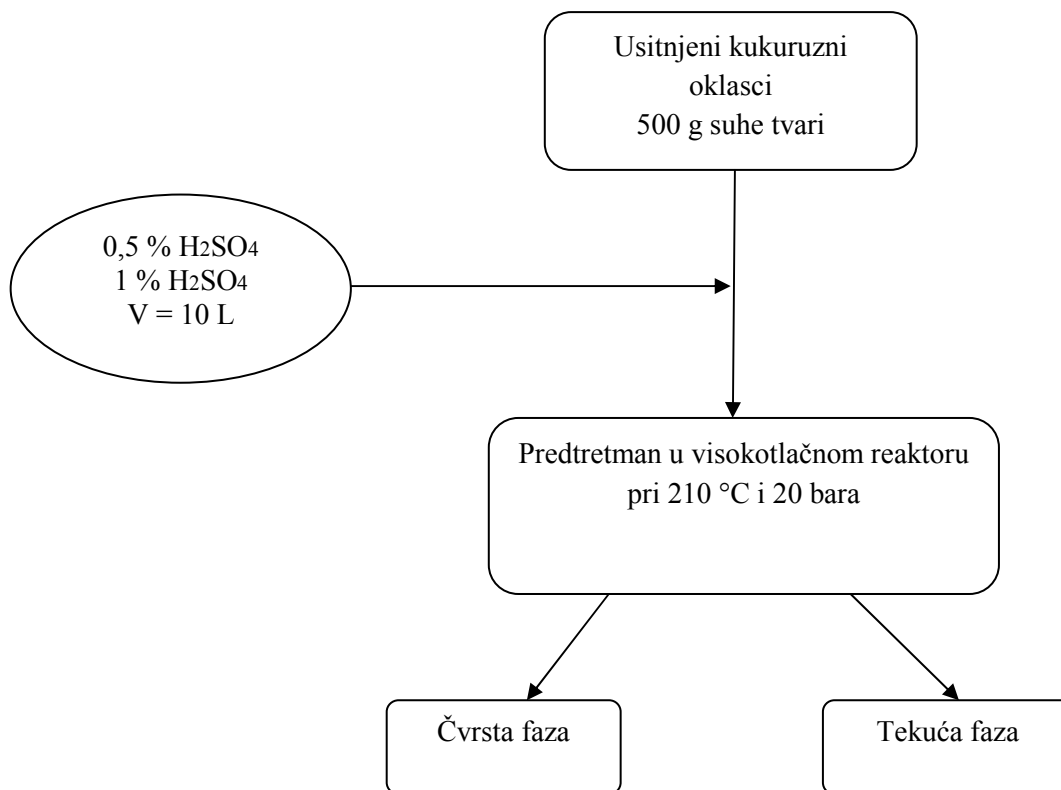
### **3.2.1. Priprema sirovine**

Kako bi se povećala učinkovitost kiselinske hidrolize i predobrade vodenom parom, lignocelulozna sirovina je prethodno mehanički ustinjena. Kukuruzni oklasak je samljeven u mlinu čekičaru–tip NA45 (poglavlje 3.1.3.1.). Za usitnjavanje kukuruznog oklasaka korišteno je sito veličine 5 mm.

### **3.2.2. Predobrada vodenom parom u visokotlačnom reaktoru**

Prethodno usitnjena sirovina sadžavala je 92,16 % suhe tvari pa je izvagano 542,53 g sirovine odnosno, 500 g suhe tvari sirovine koja je prenesena u poroznu metalnu košaru pa u visokotlačni reaktor. U reaktor je dodano 9942,5 mL vodovodne vode i 57,25 mL 96% sumporne kiseline tako da je ukupni volumen u reaktoru 10 L. Nakon toga se reaktor hermetički zatvara i započinje zagrijavanje termičkog ulja koje služi za zagrijavanje reaktora. Nakon što se postigne temperatura od 210 °C i tlak od 20 bara zadržavaju se na navedenim procesnim parametrima određeno vrijeme. Napravljena su četiri takva eksperimenta kojima se

mijenjalo vrijeme zadržavanja (Tablica 3). Nakon svakog eksperimenta dobivene su dvije faze (tekuća i čvrsta) koje su zasebno analizirane.



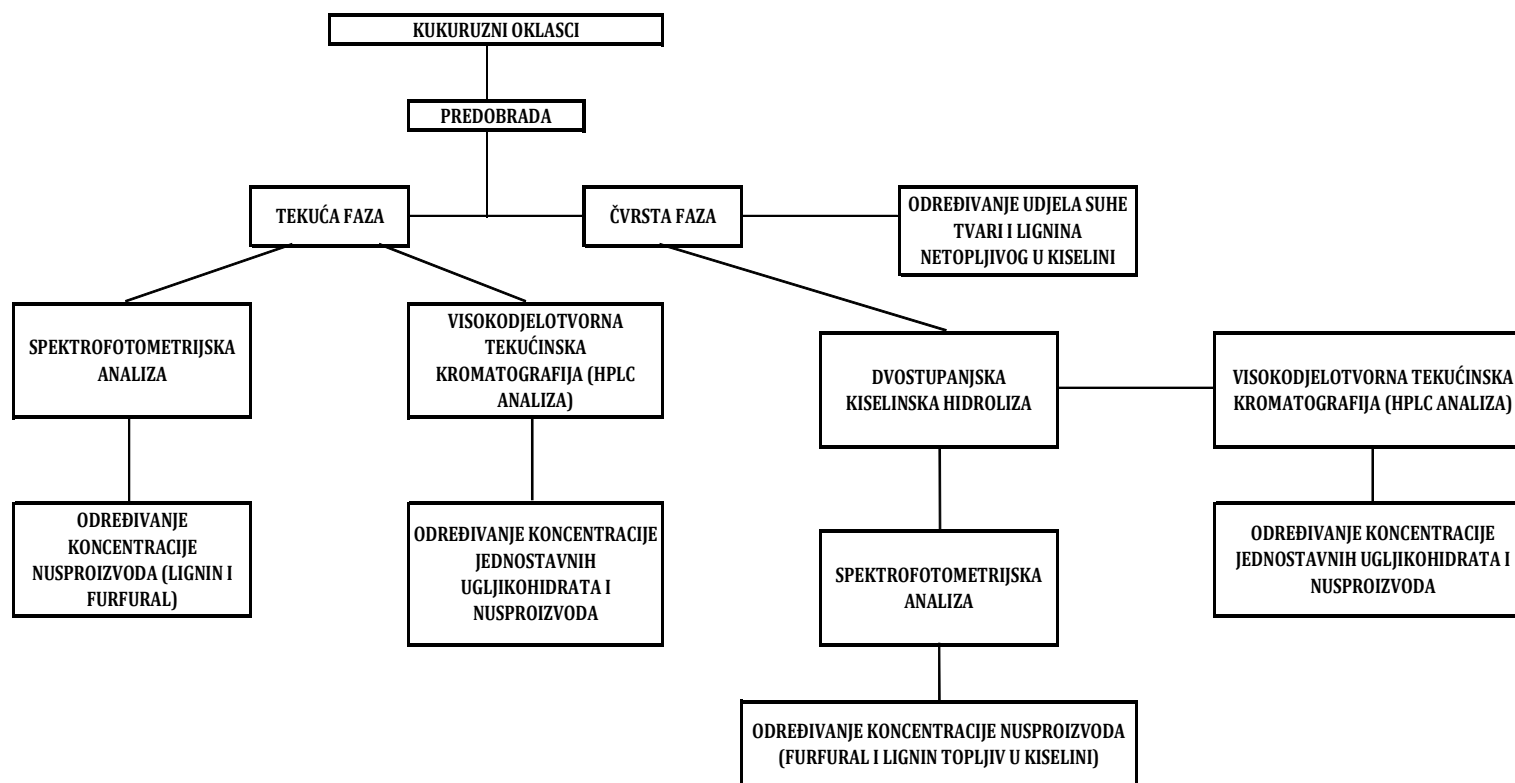
**Slika 9.** Shematski prikaz predobrade kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru

**Tablica 3.** Uvjeti pri kojima je provedena predobrada lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru.

<b>m<sub>oklasci</sub></b> <b>(g)</b>	<b>t<sub>pare</sub></b> <b>(°C)</b>	<b>p<sub>pare</sub></b> <b>(bar)</b>	<b>t<sub>z</sub></b> <b>(min)</b>	<b>V<sub>0</sub></b> <b>(L)</b>	<b>w<sub>H2SO4</sub></b> <b>(%)</b>	<b>Oznaka</b>
500	210	20	1	10	1,0	oklasci/210 °C/1 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /1 min
500	210	20	5	10	1,0	oklasci/210 °C/1 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /5 min
500	210	20	10	10	1,0	oklasci/210 °C/1 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /10 min
500	210	20	5	10	0,5	oklasci/210 °C/0,5 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /5 min

### 3.2.3. Analitičke metode

Schema postupaka analize uzoraka nakon predobrade kukuruznih oklasaka prikazana je na slici 10.



**Slika 10.** Shema postupaka za analizu uzoraka nakon predobrade lignocelulozne sirovine

### 3.2.3.1. Određivanje udjela suhe tvari

Staklene petrijeve zdjelice (petrijevke) sušile su se u sušioniku 1 sat do konstantne mase, zatim su se hladile u eksikatoru najmanje desetak minuta i na kraju vagale na analitičkoj vagi. U njih je odvagano 25 g čvrste faze dobivene nakon predobrade kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru i stavljene su u sušionik na sušenje minimalno 24h. Nakon sušenja, izvagana je masa petrijevke sa osušenom čvrstom fazom te udio suhe tvari (s.tv.) izračunat prema formuli:

$$w(s. tv.) = \frac{m(\text{petrijevke nakon sušenja}) - m(\text{prazne petrijevke})}{m(\text{odvaganog uzorka})} * 100$$

### 3.2.3.2. Određivanje udjela lignina topivog u kiselini u čvrstoj fazi hidrolizata kukuruznih oklasaka

Određivanje topivog lignina provedeno je u filtratu nakon dvostupanjske hidrolize čvrste faze mjerenjem apsorbancije spektrofotometrom pri valnoj duljini od 205 nm. Udio lignina topivog u kiselini (w(LTK)) je izračunat pomoću formule:

$$w(LTK) = \frac{A * D * V}{a * b * m} * 100$$

A - apsorbancija uzorka na 205nm

D - faktor razrjeđenja

V - volumen filtrata

a – konstanta, 110 g/Lcm

m – masa uzorka uzetog u analizu (g)

### 3.2.3.3. Dvostupanjska kiselinska hidroliza lignoceluloznih sirovina

Ovom metodom analiziran je sastav samljevene sirovine i uzorci čvrste faze nakon predobrade oklasaka u visokotlačnom reaktoru zbog određivanja koncentracije ugljikohidrata i lignina topivog i netopivog u kiselini. U tikvicu s okruglim dnom dodano je po 0,4 g uzorka

i 4 mL 72 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nakon jednog sata inkubacije na temperaturi od 30 °C, sirovini je dodano 112 mL demineralizirane vode tako da je koncentracija sulfatne kiseline iznosila 4 %. Uzorci su kuhani 4 sata uz povratno hladilo. Sadržaj u tikvici povremeno je miješan okretanjem tikvice kako bi se ostvario što bolji kontakt lignocelulozne sirovine i kiseline. Nakon kuhanja, uzorak je ohlađen pod mlazom vode, profiltriran kroz celulozni filter postavljenog na Buchnerov lijevak. U zaostalom čvrstom dijelu sirovine na filter papiru određen je lignin netopiv u kiselini, a u filtratu koncentracija glukoze, ksiloze, arabinoze, celobioze, levulinske kiseline, octene kiseline, mravlje kiseline, furana i lignina topivog u kiselini.

#### **3.2.3.4. Određivanje furfurala u tekućoj fazi hidrolizata kukuruznih oklasaka**

Koncentracija furfurala je određivana u tekućoj fazi te u filtratu nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Za određivanje furfurala pomoću spektrofotometra je potreban baždarni pravac koji se prethodno napravi mjerenjem apsorbancija otopina furfurala poznatih koncentracija. Uzorak s nepoznatom koncentracijom furfurala se razrjeđuje demineraliziranom vodom u omjeru 1:1000 te se mjeri apsorbancija na 284 nm i 320 nm. Koncentracija se određuje iz jednadžbe baždarnog pravca ( $\gamma_{\text{furfural}} = 2,496 \cdot \Delta A + 0,0158$ ;  $R^2 = 0,998$ ).

#### **3.2.4. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)**

##### **3.2.4.1. Priprema uzoraka čvrste faze hidrolizata za HPLC analizu**

Dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom je dobiven filtrat koji je potom neutraliziran dodatkom Ca(OH)<sub>2</sub> do pH vrijedosti od oko 5-6 jedinica. Uzorak je zatim centrifugiran (5000 g, 5min; HC-240, Tehnica, Železniki, Slovenija), a dobiveni supernatant je profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine 0,2 μm (33 mm; Carl Roth, GmbH & Co, Karlsruhe, Njemačka). Ovako pripremljeni uzorci analizirani su pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> sustava.

### **3.2.4.2. Priprema uzorka tekuće faze hidrolizata za HPLC analizu**

Volumenu od 700  $\mu\text{L}$  neutraliziranog uzorka tekuće faze hidrolizata dodano je 700  $\mu\text{L}$  10 %-tne otopine cinkova sulfata heptahidrata. Uzorci su zatim snažno izmiješani tijekom 20-tak sekundi (mikser EV-100, Tehtnica, Železniki, Slovenija) i ostavljeni da odstoje 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Dobiveni talog izdvojen je centrifugiranjem (10000 g, 5 min; 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 $\mu\text{m}$ /25mm; Machery-Nagel CoKG, Düren, Njemačka). Pripremljeni uzorci su analizirani pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> sustava (poglavlje 3.2.3.3.).

### **3.2.4.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)**

Kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan) korišten je za određivanje jednostavnih ugljikohidrata glukoze, ksiloze, arabinoze i celobioze te mravlje, octene i levulinske kiseline u uzorcima čvrste i tekuće faze nakon predobrade kukuruznih oklasaka. Za analizu priređenih uzoraka korištena je modificirana kromatografska metoda opisana u radovima Trontel i sur. (2010, 2011). Kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina fosforne kiseline. Injektirano je 20  $\mu\text{L}$  uzorka u sustav. Protok mobilne faze je 0,5 mL  $\text{min}^{-1}$ , a temperatura ionsko-izmjenjivačke analitičke kolone (Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9  $\mu\text{m}$ ) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9  $\mu\text{m}$ ) pri 55 °C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma. Procjena rezultata kromatografske analize napravljena je pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10 i pripadajuće vrijednosti su očitane iz baždarnih pravaca.



**Tablica 4.** Retencijska vremena i baždarni pravci.

<b>naziv spoja</b>	<b>retencijsko vrijeme (min)</b>	<b>jednadžba baždarnog pravca</b>	<b>R<sup>2</sup>(-)</b>
arabinoza	19,825 ± 0,026	A = 225152 $\gamma_{\text{arabinoza}}$ + 562,39	0,9999
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
levulinska kiselina	21,388 ± 0,051	A = 207915 $\gamma_{\text{levulinska kiselina}}$ + 3222,5	0,9998
mravlja kiselina	18,520 ± 0,018	A = 82201 $\gamma_{\text{mravlja kiselina}}$ - 8125,4	0,9983
octena kiselina	19,825 ± 0,026	A = 112445 $\cdot \gamma_{\text{octena kiselina}}$ + 1276,1	0,9989

\*retencijsko vrijeme izraženo kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

### 3.2.4.4. Izrada baždarnog pravca za određivanje koncentracije ugljikohidratnih jedinica

Otopine standarda pripravljene su kao otopine šećera (glukoze, ksiloze, arabinoze, celobioze), odnosno otopine kiselina (octena, mravlja i levulinska) u deioniziranoj vodi u koncentracijama: 0,1 mg mL<sup>-1</sup>, 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, 1 mg mL<sup>-1</sup>, 2 mg mL<sup>-1</sup>, 5 mg mL<sup>-1</sup>, 10 mg mL<sup>-1</sup> i 35 mg mL<sup>-1</sup>. Uzorci su analizirani pomoću kromatografskog sustava Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan) uz tri ponavljanja. Za svaki uzorak određena je površina pika s obzirom na koncentraciju arabinoze u otopini (8. Prilozi, Prilog 1-8).

## **4. REZULTATI**

#### **4. REZULTATI**

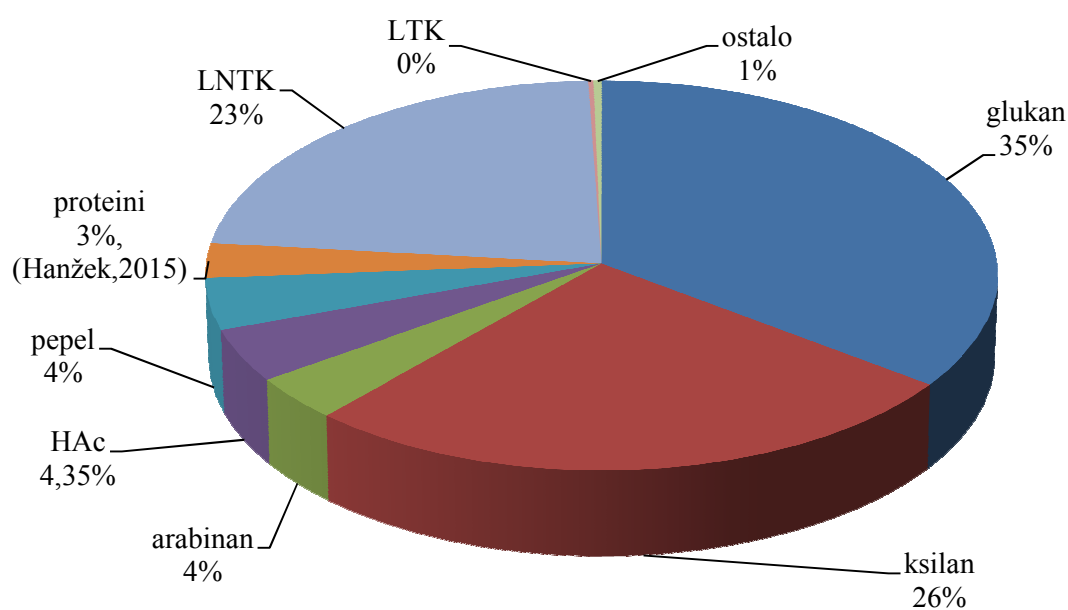
U ovom je radu analiziran je sastav lignocelulozne sirovine – kukuruznog oklaska. Nakon toga je provedena predobrada kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru pri određenim uvjetima. Za zakiseljavanje suspenzije kukuruznih oklasaka tijekom predobrade u visokotlačnom reaktoru korištena je sumporna kiselina. Predobrada je provedena u rasponu vremena zadržavanja od 1 do 10 minuta pri konstantnom tlaku pare (20 bara) i temperaturi (210 °C). Sveukupno su provedena četiri eksperimenta. Tri predobrade provedene su pri 210 °C i 20 bara vodene pare uz dodatak 1,0 % sumporne kiseline tijekom 1, 5 i 10 minuta. Uvjeti procesa pri kojima je postignuta najveća koncentracija ukupnih ugljikohidrata (glukoze, ksiloze i arabinoze) korišteni su za provođenje procesa pri nižoj koncentraciji kiseline od 0,5 %.

Rezultati eksperimenata podijeljeni su u 3 poglavlja:

- a) Analiza sastava lignocelulozne sirovine – kukuruznog oklaska (poglavlje 4.1)
- b) Određivanje sastava tekuće faze hidrolizata kukuruznih oklasaka (poglavlje 4.2.)
- c) Određivanje sastava čvrste faze hidrolizata kukuruznih oklasaka (poglavlje 4.3)

#### 4.1. Analiza sastava lignocelulozne sirovine – kukuruznog oklaska

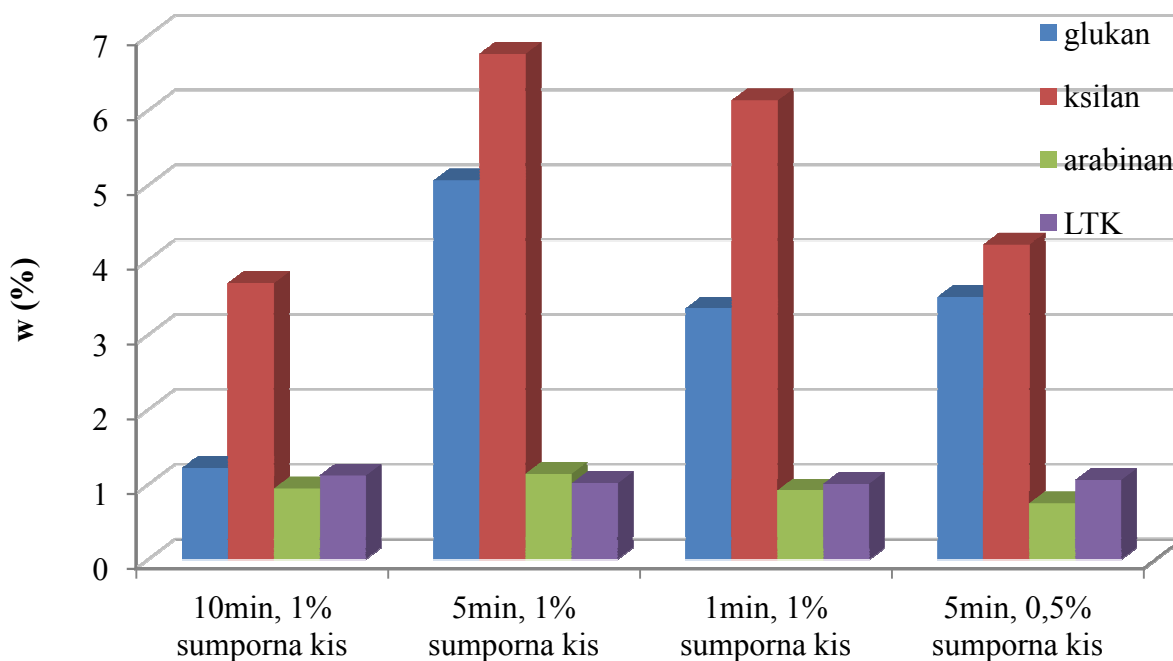
Nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize kukuruznih oklasaka dobiveni hidrolizat je profiltriran (poglavlje 3.2.3.3.). U dobivenom filtratu određena je koncentracija ugljikohidrata (celobioze, ksiloze, glukoze i arabinoze) i octene kiseline tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (poglavlje 3.2.4.3.). Dok je udio lignina topivog u kiselini određen spektrofotometrijski (poglavlje 3.2.3.2.) U talogu zaostalom nakon filtracije određen je udio lignina netopivog u kiselini i pepela (poglavlje 3.2.3.1.). Sastav sirovine prikazan je na slici 12.



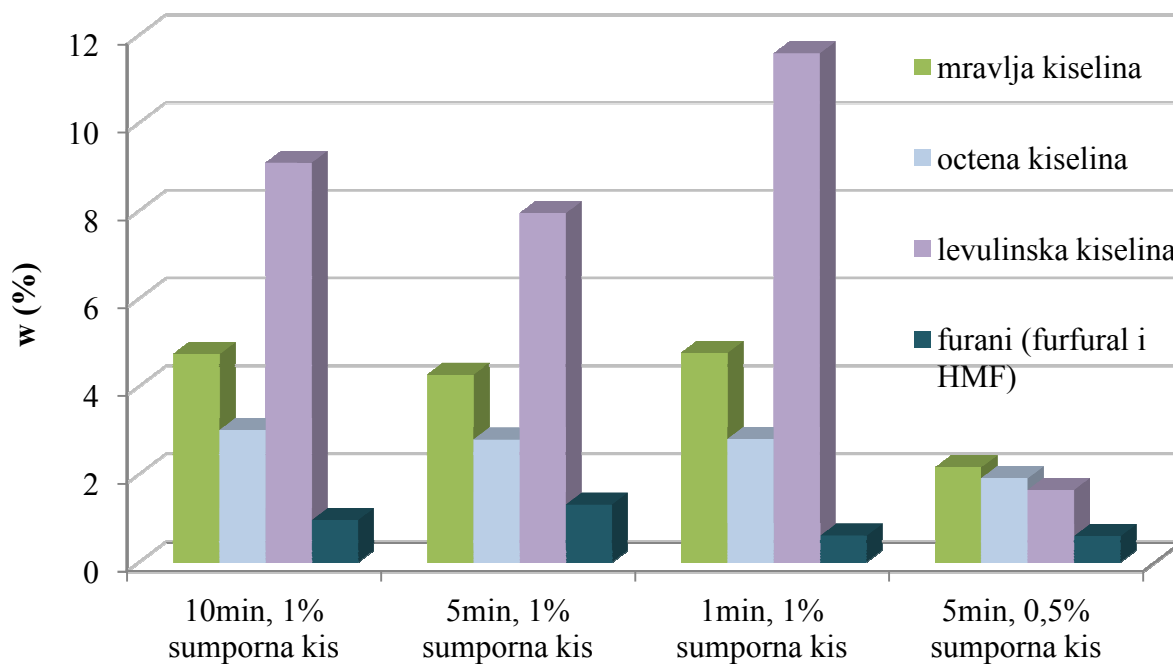
**Slika 11.** Sastav kukuruznih oklasaka dobiven nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize (HAc, octena kiselina; LTK, lignin topiv u kiselini, LNTK, lignin netopiv u kiselini).

#### 4.2. Određivanje sastava tekuće faze hidrolizata kukuruznih oklasaka

Nakon predobrade pri različitim procesnim parametrima u visokotlačnom reaktoru (Tablica 3, poglavlje 3.2.2.) određena je koncentracija arabinoze, ksiloze, glukoze i lignina topivog u kiselini (LTK) u tekućoj fazi - hidrolizat (poglavlje 3.2.4.2.). Osim koncentracija ugljikohidrata određena je i koncentracija octene kiseline i nusproizvoda predobrade kao što su levulinska kiselina, mravlja kiselina (poglavlje 3.2.4.2) i furani (furfural i HMF) (poglavlje 3.2.3.4.).



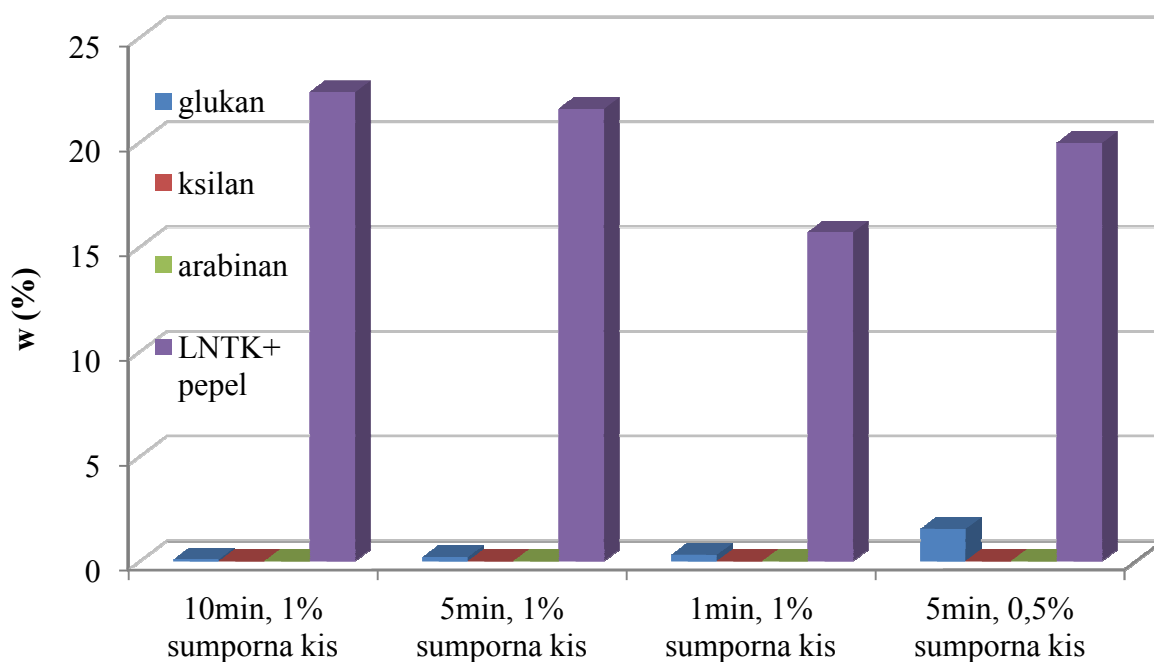
**Slika 12.** Udio ugljikohidrata u hidrolizatu (tekuća faza) dobivenom nakon predobrade kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru.



**Slika 13.** Količina nusprodukata (toksičnih spojeva) u hidrolizatu (tekuća faza) dobivenom nakon predobrade kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru.

### 4.3. Određivanje sastava čvrste faze hidrolizata kukuruznih oklasaka

Nakon predobrade kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru, čvrsta faza, odnosno kruti dio se suši te se provodi dvostupanjska kiselinska hidroliza. Koristeći visokoučinkovitu tekućinsku kromatografiju određena je koncentracija arabinoze, ksiloze, glukoze, celobioze i octene kiseline (poglavlje 3.2.4.1.) u filtratu dobivenom nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize čvrste faze (poglavlje 3.2.3.3). Lignin netopiv u kiselini (LNTK) i pepeo određeni su u zaostalom čvrstom dijelu sirovine nakon prethodnog vaganja krutog dijela predobrađenih kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru te ispiranjem na filter papiru s naljevima vruće vode malih volumena (poglavlje 3.2.3.1.). Dobiveni su rezultati prikazani na slici 15.



**Slika 14.** Količina ugljikohidrata u čvrstoj fazi hidrolizata dobivenoj nakon predobrade kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru.

## **5. RASPRAVA**



## 5. RASPRAVA

### 5.1. Analiza sastava lignocelulozne sirovine – kukuruznog oklaska

Lignocelulozni materijali predstavljaju obnovljive i jeftine sirovine u brojnim biotehnološkim procesima (Nigam i Pandey, 2009, Philippoussis, 2009; Buljubašić, 2012, Lacković, 2012; Lešić, 2014). Važno je poznavati točan sastav lignoceluloznih sirovina za razvoj biotehnoloških procesa i procjenu njihove ekonomske održivosti, kao i za zadovoljavanje kriterija održivog razvoja (Balat, 2011). Lignin može uzrokovati niz problema prilikom korištenja lignoceluloznih sirovina (Jørgensen i sur., 2007; Janušić i sur., 2008, Škoro, 2014). S obzirom na ta saznanja, u ovom radu su kukuruzni oklasci predobrađeni termičkom predobradom u visokotlačnom reaktoru s kiselinom  $H_2SO_4$  kao katalizatorom pri koncentracijama kiseline 0,5 % i 1,0 %.

Sastav lignoceluloznih sirovina određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti nakon dvostupanjske hidrolize. Sirovina je prema dobivenim rezultatima sadržavala 35 % glukana, 26 % ksilana i 4 % arabinana što sveukupno znači da je udio ugljikohidrata u kukuruznim oklascima oko 65 % (poglavlje 4.1.). Druga najveća komponenta kukuruznih oklasaka je lignin netopiv u kiselini i pepeo (23 %), dok udio lignina koji je topiv u kiselini iznosi 0,22 %. Udio proteina iznosi 3 % (Hanžek, 2015) i octene kiseline 4,35 %. Wang i sur. (2011) odredili su prosječan sastav kukuruznog oklaska i on iznosi: 40-44 % celuloze; 31-33 % hemiceluloze i 16-18 % lignina. Rezultati analize sastava kukuruznog oklaska dvostupanjskom hidrolizom odgovaraju rezultatima od Wang i sur. (2011). Male razlike u navedenim vrijednostima mogu biti zbog različitih sorti kukuruza i korištenih analitičkih metoda.

### 5.2. Određivanje sastava tekuće faze hidrolizata kukuruznih oklasaka

Nakon predobrade kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru dobile su se dvije faze hidrolizata (poglavlje 3.2.2.). Tekuća faza je analizirana spektrofotometrijski (masa ukupnih furana) i pomoću HPLC metode. HPLC metodom je utvrđena masa monomernih ugljikohidratnih jedinica (glukana, arabinana i ksilana) i lignina topivog u kiselini i rezultati su prikazani u ovom radu (poglavlje 4.2. slika 13). Prema dobivenim rezultatima masa lignina topivog u kiselini nakon provedenih postupaka predobrade pri vremenima zadržavanja od 1 do 10 min približno je jednaka i iznosi od 1,01 do 1,12 %. Slično tome i vrijednosti za

arabinan su približno jednake i iznose oko 1,0 %. Masa glukana i ksilana vidljivo varira. Tijekom predobrade pri uvjetima 210 °C/1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/10 min dobivena je najmanja količina glukana i ksilana koje iznose 0,99 % za glukan i 2,98 % za ksilan. Nakon predobrade kukuruznih oklasaka (210 °C/1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/5 min) dobiva se najveći udio fermentabilnih ugljikohidrata, izraženih kao glukan i ksilan, koja iznosi 5,06 % za glukan i 6,76 % za ksilan. S obzirom da su pri uvjetima 210 °C/1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/5 min dobivene najviše vrijednosti za masu glukana i ksilana u odnosu na ostale eksperimente, provedena je predobrada kukuruznih oklasaka pri istoj temperaturi, tlaku i vremenu zadržavanja, ali sa manjom koncentracijom sumporne kiseline od 0,5 % (oklasci/210 °C/0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/5 min). Ovim postupkom je dobiveno samo 3,52 % glukana i 4,2 % ksilana. Iz toga je vidljivo da takvi uvjeti nisu doprinijeli povećanju udjela fermentabilnih ugljikohidrata.

Osim koncentracije ugljikohidrata u hidrolizatu, tijekom ovih postupaka određena je i koncentracija octene, levulinske i mravlje kiseline, ali i furana.

Pri temperaturi od 210 °C, koncentraciji H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> od 1,0 % i uvjetima zadržavanja od 1 min, 5 min i 10 min dobivena je približno isti udio octene kiseline (2,80-3,01 %). Dok je pri koncentraciji H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> od 0,5 % udio octene kiseline bio smanjen za oko 35% i iznosila je 1,91 % pri vremenu zadržavanja od 5 min.

Pri temperaturi od 210 °C, koncentraciji H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> od 1,0 % i uvjetima zadržavanja od 1 min, 5 min i 10 min dobiveno je redom 11,59 %, 7,95 % i 9,10 % levulinske kiseline. Levulinska kiselina nastaje razgradnjom HMF pri visokoj temperaturi i u prisutnosti kiseline (Jönsson i sur., 2013) Nakon predobrade pri smanjenoj koncentraciji sumporne kiseline (oklasci/210 °C/0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/5 min) proizvedeno je samo 1,65 % levulinske kiseline. Na taj način je udio ovog toksičnog spoja umanjeno za oko 80 %.

Osim levulinske kiseline, tijekom ovog procesa iz HMF i furfurala nastaje i mravlja kiselina (Jönsson i sur., 2013). Udio mravlje kiseline koja je nastala tijekom predobrade pri temperaturi od 210 °C, koncentraciji H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> od 1,0 % i uvjetima zadržavanja od 1 min, 5 min i 10 min je približno jednak i iznosi od 4,27 % do 4,77 %. Dok je nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru pri koncentraciji H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> od 0,5 % udio mravlje kiseline bio smanjen za oko 50 % i iznosila je samo 2,16 % pri vremenu zadržavanja od 5 min.

Udio ukupnih furana (furfural i HMF) nastalih tijekom predobrade s 1,0 % sumpornom kiselinom bio je u rasponu od 0,61 % do 1,31 %, dok je pri koncentraciji H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> od 0,5 % iznosio 0,60 %.

S obzirom na visoke vrijednosti dobivene za toksične spojeve tijekom predobrade pri uvjetima 210 °C/1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/1 min, 210 °C/1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/5 min i 210 °C/1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/10 min može se zaključiti da odabrani uvjeti nisu bili odgovarajući za hidrolizu kukuruznih oklasaka.

### 5.3. Određivanje sastava čvrste faze hidrolizata kukuruznih oklasaka

Udio ugljikohidrata u čvrstoj fazi hidrolizata kukuruznih oklasaka određen je nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize koristeći visokodjelotvornu tekućinsku kromatografiju, a dobiveni rezultati su prikazani u poglavlju 4.3., slika 15. U sastavu čvrste faze hidrolizata nalazi se vrlo malo glukana što u prosjeku nakon provedenih eksperimenata pri uvjetima 210 °C/0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> s različitim vremenima zadržavanja (1, 5, 10 min) iznosi od 0,08 do 0,3 %. No, pri uvjetima (oklasci/210 °C/0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/5 min) određen je udio glukana u iznosu od 1,54 %. U čvrstoj fazi hidrolizata nisu određeni monosaharidi kao što su ksilan i arabinan što ukazuje na potpunu hidrolizu hemiceluloze tijekom provedenih proces predobrade. Lignin netopiv u kiselini i pepeo određeni su i u čvrstoj fazi te je određena njihova zajednička masa. Najveće vrijednosti (22,36 %) određene su pri vremenu zadržavanja od 10 min. U ovom slučaju gotovo svi ugljikohidrati iz sirovine su hidrolizirani.

Nusproizvodi, u čvrstoj fazi hidrolizata nakon predobrade kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru, su potpuno izostali iz čvrste faze. U posljednjem postupku predobrade kukuruznih oklasaka (210 °C/0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/5 min) dobivena je veća količina mravlje kiseline koja iznosi 1,25 % vjerovatno jer čvrsta faza, nakon predobrade i provođenja dvostupanjske kiselinske hidrolize nije isprana dovoljnom količinom vruće vode.

## **6. ZAKLJUČAK**

## **6. ZAKLJUČAK**

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

1. Kukuruzni oklasci sastoje se od 35 % glukana, 26 % ksilana, 4 % arabinana, 23 % lignina netopivog u kiselini i pepela. Određen je i udio octene kiseline (4,35 %) i lignina topivog u kiselini (4,45 %).
2. Najveća efikasnost procesa predobrade kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru (210 °C/20 bara) ostvarena je kod vremena zadržavanja od 5 minuta uz 1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pri čemu je u tekućoj fazi hidrolizata određeno 5,06 % glukana, 6,76 % ksilana, 1,14 % arabinana i 1,02 % lignina topivog u kiselini. U čvrstoj fazi hidrolizata u tim uvjetima određen je udio glukana od 0,18 %, odnosno lignina netopivog u kiselini i pepela od 21,59 %.
3. Smanjenje koncentracije H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u postupku predobrade na 0,5 % (210 °C/20 bara/5 min) rezultiralo je značajnim smanjenjem koncentracije nusproizvoda procesa predobrade kao što su levulinska kiselina za 80 %, odnosno mravlja kiselina za 50 % u odnosu na eksperiment proveden kod 210 °C/20 bara/5 min uz 1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
4. Na osnovi rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da je neophodan dio procesa daljnje optimizacije predobrade kukuruznih oklasaka za primjenu njihovog hidrolizata u procesu proizvodnje bioetanola.

## **7. LITERATURA**

## 7. LITERATURA

1. Alviera P., Tomas-Pejo E., Ballesteros M., Negro M. J. (2009) Preatreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* **101**(13), 4851-4861.
2. Anonimus 1 (2016) Chemistry in the News: Biofuels <<http://organici.blogspot.hr/2013/09/chemistry-in-news-biofuels.html>> Pristupljeno 15.lipnja 2016.
3. Anonimus 2 (2016) Hemicellulose <<https://en.wikipedia.org/wiki/Hemicellulose>> Pristupljeno 20.lipnja 2016.
4. O'Sullivan, A. C. (1997) Cellulose: the structure slowly unveils. *Cellulose*, **4**, 173-207.
5. Anwar, Z., Gulfranz, M., Irshada, M. (2014) Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **7**(2), 163-173.
6. Azzam, A.M. (1989) Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *J. Environ. Sci. Health. B*, **24**(4), 421-433.
7. Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway, A review, *Energ. Convers. Manage.* **52**, 858-875.
8. Bjerre, A.B., Olesen, A.B., Fernqvist, T. (1996) Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 568-577
9. Bobleter, O. (1994) Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polym. Sci.* **19**, 797-841
10. Brownell, H. H., Yu, E. K. C., Saddler, J. N. (1986) Steam-explosion pretreatment of wood: effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 792-801.
11. Buljubašić, M. (2012) Mogućnosti korištenja lignoceluloznih sirovina poljoprivrednog porijekla u Republici Hrvatskoj. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
12. Cadoche, L., Lopez, G. D. (1989) Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biol. Wastes*, **30**, 153-157.
13. Dale, B.E., Henk, L.L., Shiang, M. (1984) Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammonia freeze-explosion. *Dev. Ind. Microbiol.* **26**, 223-233.

14. Demirbas, A. (2008) The importance of bioethanol and biodiesel from biomass, *Energy Source B*, **3**, 177-85.
15. Dottori, F., A., Benson, R. A. C., Benech, R.O. (2013) Two-stage continuous pre-treatment of lignocellulosic biomass. Patent no: WO2013013318.
16. Duff, S. J. B., Murray, W. D. (1996) Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* **55**, 1–33.
17. Eisenhuber, K., Jäger, A., Wimberger, J., Kahr, H. (2013) Comparison of different pretreatment methods for straw for lignocellulosic bioethanol production. *Agron. Res.* **11**, 173–182.
18. Fan, L. T., Gharpuray, M. M., Lee, Y. H., (1987) Cellulose hydrolysis. *Springer-Verlag*, Berlin, Germany, str 57.
19. Fengel, D., Wegener, G. (1984) *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. De Gruyter, Berlin, str 23-103.
20. 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.
21. Hames, B. R. (2009) Biomass compositional analysis for energy applications. U: Biofuels, Methods In Molecular Biology Vol. **581**, ( Mielenz J.R. ured), Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, New York/Berlin, str. 145-167.
22. Hanžek, M. (2015) Utjecaj alkalne obrade kukuruznih oklasaka na udjele lignina i celuloze. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
23. Hendricks, A. T., Zeeman, G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **100**, 10-18.
24. Ioannidou, O., Zabaniotou, A., Antonakou, E.V., Papazisi, K. M., Lappas, A. A., Athanassiou, C. (2009) Investigating the potential for energy, fuel, materials and chemicals production from corn residues (corn and stalks) by non-catalytic and catalytic pyrolysis in two reactor configurations, *Renew. Sust. Energ. Rev.* **13**, 750-762.
25. Janušić, V., Čurić, D., Krička, T., Voća, N., Matin, A. (2008) Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. *Poljoprivreda*, **14** (1), 53-58.
26. Jönsson, L. J., Alriksson, B., Nilvebrant, N. O. (2013) Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 16.
27. Jørgensen, H., Kristensen, J. B., Felby, C. (2007) Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioprod. Bioref.* **1**, 119–134.



28. Freudenberg, K., Neish, A. C. (1968) Constitution and biosynthesis of lignin. Springer Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, str.8.
29. Gray, K. A., Zhao, L., Emptage, M. (2006) Bioethanol, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 141–146.
30. Kohlmann, K. L., Sarikaya, A., Westgate, P. J., Weil, J., Velayudhan, A., Hendrickson, R., Ladisch, M. R. (1995) Enhanced enzyme activities on hydrated lignocellulosic substrates. U: Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates (Saddler, J. N., Penner, M.H., ured.), *ACS Publishing*, Washington DC, str. 237-255.
31. Lacković, I. (2012) Korištenje lignoceluloznih sirovina za uzgoj makrofunga na čvrstim supstratima, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
32. Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E., (2005) Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1081–1099.
33. Lešić, T. (2014) Analiza ekstraktivnih tvari i lignina u bukovoj piljevini, pšeničnoj slami i kukuruznim oklascima. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu .
34. Levan, S. L., Ross, R. J., Winandy, J. E. (1990) Effects of fire retardant chemicals on bending properties of wood at elevated temperatures. Research Paper FPL-RP-498. Madison, WI: U.S. Department of agriculture, Forest service, Forest Products Laboratory, str. 1-26.
35. Mackie, K. L., Brownell, H. H., West, K. L., Saddler, J. N. (1985) Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspen wood. *J. Wood Chem. Technol.* **5**, 405–425.
36. McMillan, J. D. (1994) Pretreatment of lignocellulosic biomass. U: Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production (Himmel, M. E., Baker, J. O., Overend, R. P. ured.). American Chemical Society, Washington DC, str. 292–324.
37. Morjanoff, P.J., Gray, P.P. (1987) Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. *Biotechnol. Bioenergy* **29**, 733–741.
38. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y. (2005) Features of promising technologies for preapreatment of lignocelulosic biomass, *Biores. Technol.* **96**, 673-686.
39. Mullen, C. A., Boateng, A. A., Goldberg, N. M., Lima, I. M., Laird, D. A., Hicks, K. B. (2010) Bio-oil and bio-char production from corn cobs and stover by fast pyrolysis, *Biomass Bioenergy*, **34**, 67-74.

40. Nigam, S., P., Pandey, A. (2009) Utilisation of solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. U: *Biotechnology for agroindustrial residues*. (Singh-Nee Nigam, P., Pandey, A., ured.), Springer Netherlands, 197-221.
41. Olagunju, A., Onyke, E., Muhammad, A., Aliyu, S., Abdullahi, A.S. (2013) Effects of fungal (*Lachnocladium* spp.) pretreatment on nutrient and antinutrient composition of corncobs, *Afr. J. Biochem. Res.* **7**(11), 210-214.
42. Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G., Tenkanen, M., (2004) Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *J. Biotechnol.* **107**, 65–72.
43. 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.* **48**, 3713–3729.
44. Percival Zhang YH, Himmel ME, Mielenz JR. (2006) Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* **24**(5), 452-81.
45. Philippoussis, A. N. (2009) Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. U: *Biotechnology for agro-industrial residues*, (Singhnee' Nigam ,P.; Pandey A., ured.), str. 164-187.
46. Pointner, M., Kuttner, P., Obrlik, T., Jäger, A., Kahr, H. (2014) Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. *Agron. Res.* **12**(2), 391-396.
47. Pordesimo L. O., Hames B. R., Sokhansanj S., Edens W. C. (2005) Variation in corn stover composition and energy content with crop maturity. *Biomass Bioenergy*, **28**(4), 366-374.
48. Ramos, L. P. (2003) The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nova*, **26**(6), 863–871.
49. Reshamwala, S., Shawky, B. T., Dale, B. E. (1995) Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51/52**, 43–55.
50. Rezić, T. (2012) Interna skripta iz modula Biotehnologija III, Industrijska biotehnologija, Biotehnološka proizvodnja biogoriva, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, str. 1-21.
51. Rowell, R. M., Pettersen, R., Tshabalala, M. A. (2005) Cell wall chemistry. U: *Handbook of wood chemistry and wood composites* (Rowell, R. M., ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 35-74.

52. Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., Wu, Y. V. (2005) Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Proc. Biochem.* **40**, 3693-3700.
53. Saini, J.K., Saini, R., Tewari, L. (2015) Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *J. Biotech.* **5**, 337–353.
54. Silversteina, R. A., Chena, Y., Sharma-Shivappaa, R. R., Boyettea, M. D., Osborneb J. (2008) A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks, *Biores. Technol.* **98**, 3000-11.
55. Sjoström E. (1993) Wood polysaccharides U: Wood chemistry: Fundamentals and applications, 2. izdanje, Academic Press, San Diego, str. 54-70.
56. Sluiter, A., Sluiter, J., Wolfrum, E. J. (2013) Methods for biomass compositional analysis. U: Catalysis for the Conversion of Biomass and Its Derivatives (Behrens, M, Datye, A. K.,ured.), Edition Open Access, Berlin, str. 213-254.
57. Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores. Technol.* **83**, 1-11.
58. Škoro, G. (2014) Enzimaska hidroliza lignoceluloznih sirovina. Završni rad, Prehrambenobiotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
59. Timell, T. E. (1967) Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* **1**, 45-70.
60. Von Sivers, N., Zacchi, G., Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B. (1994) Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Progr.* **10**, 555–560.
61. Wang, L., Yang, M., Fan, X., Zhu, X., Xu, T., Yuan, Q. (2011) An environmentally friendly and efficient method for xylitol bioconversion with high-temperature-steaming corncob hydrolysate by adapted *Candida tropicalis*. *Proc. Biochem.* **46**(8), 1619-1626.
62. Weil, J. R., Sarikaya, A., Rau, S. L., Goetz, J., Ladisch, C. M., Brewer, M., Hendrickson, R., Ladisch, M.R. (1997) Pretreatment of yellow poplar sawdust by pressure cooking in water. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **68**(1-2), 21-40.
63. Winandy, J. E. (1995) Effects of fire retardant treatments after 19 months of exposure at 150F (66C). Res. Note FPL-RN-0264. U.S. Department of agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison, WI., str. 13.
64. Wright, J. D. (1998) Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chem. Eng. Prog.* **84**(8), 62–74.

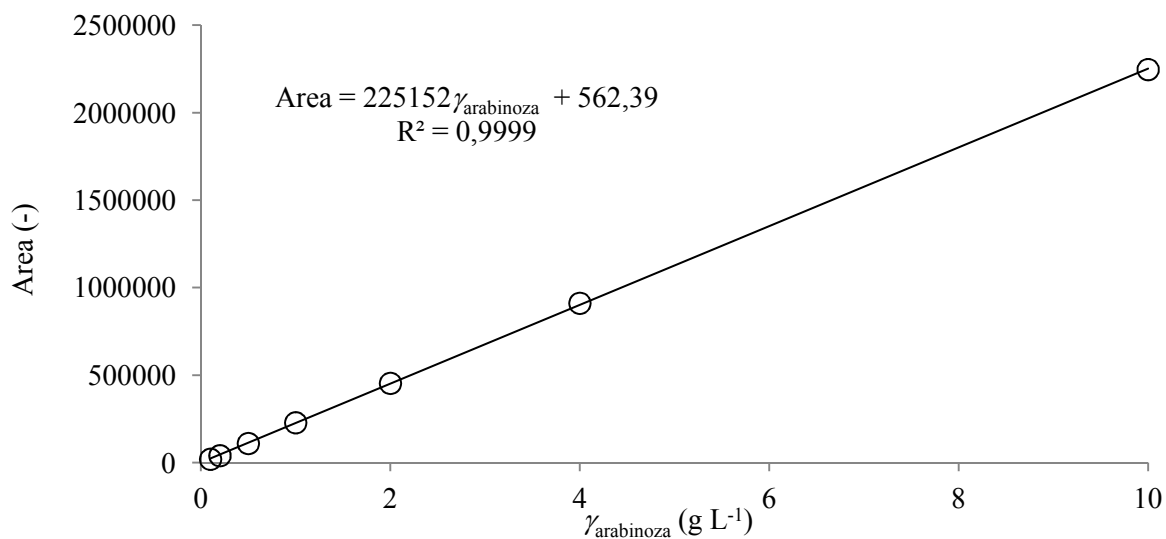
65. Zimbardi, F., Ricci, E., Braccio, G. (2002) Technoeconomic study on steam explosion application in biomass processing. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98**, 89-100.

## **8. PRILOZI**

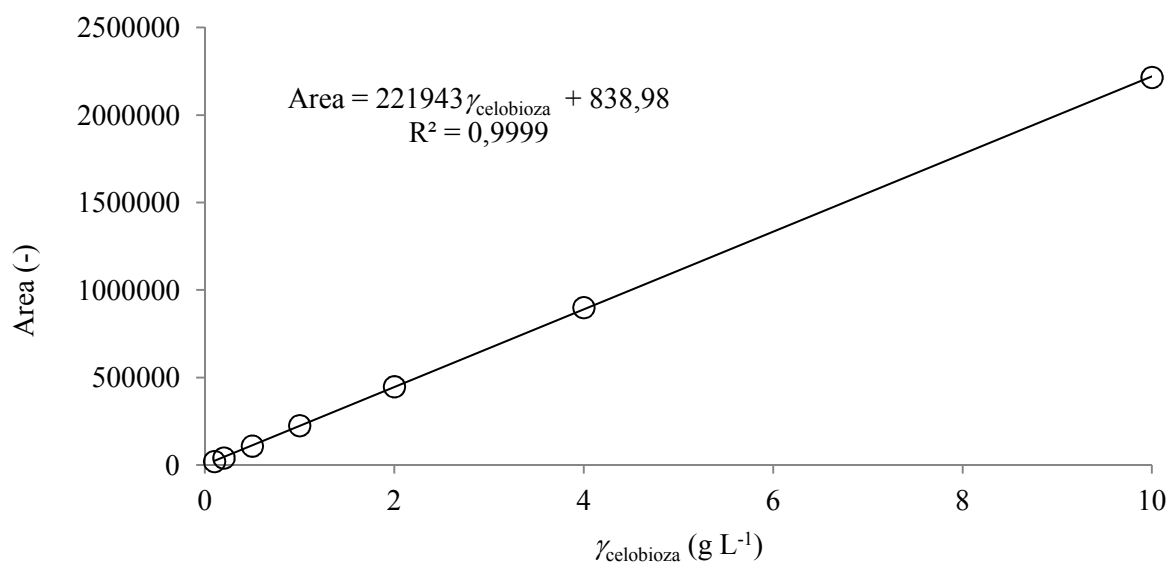
## 8. PRILOZI

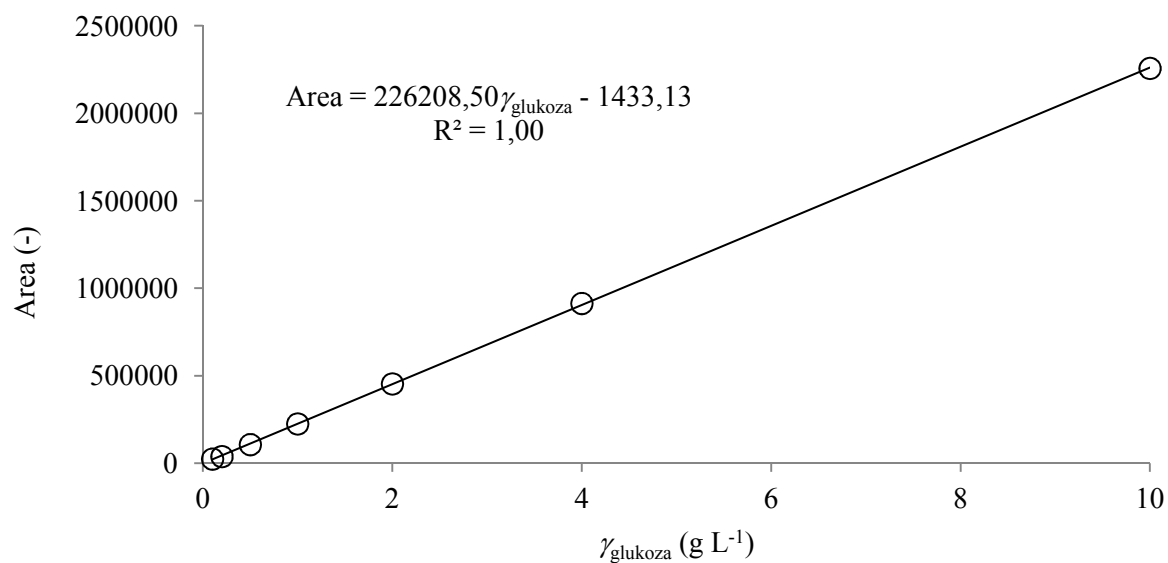
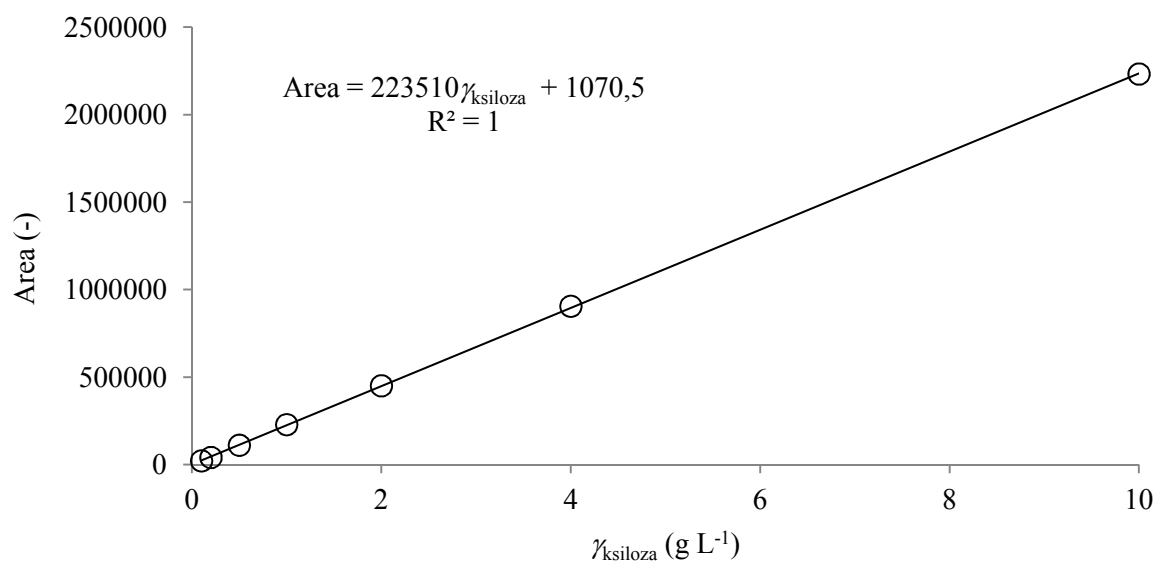
### 8.1. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracija ugljikohidrata

#### Prilog 1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije arabinoze



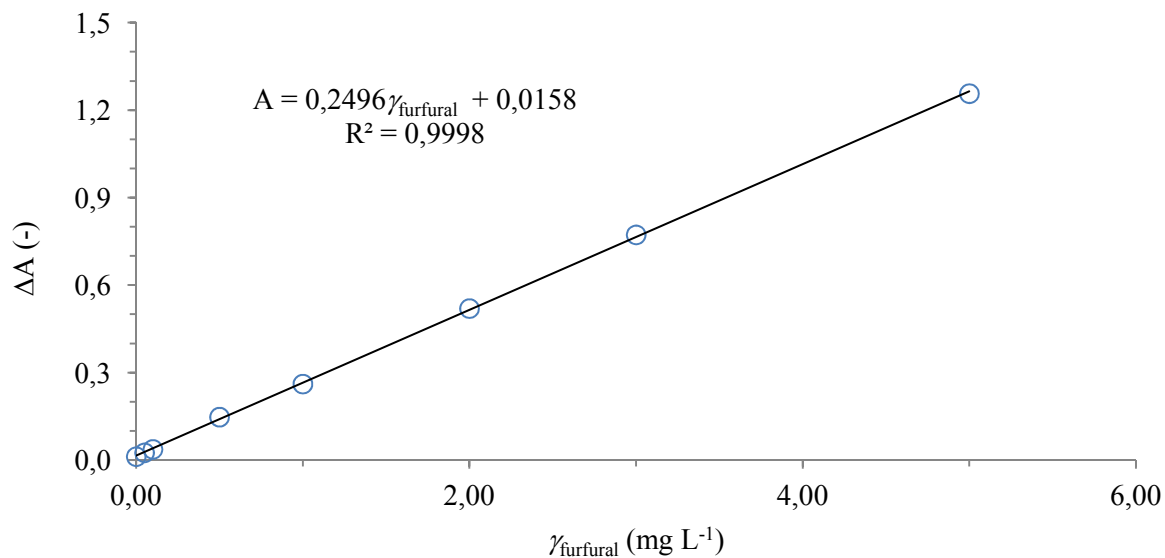
#### Prilog 2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije celobioze



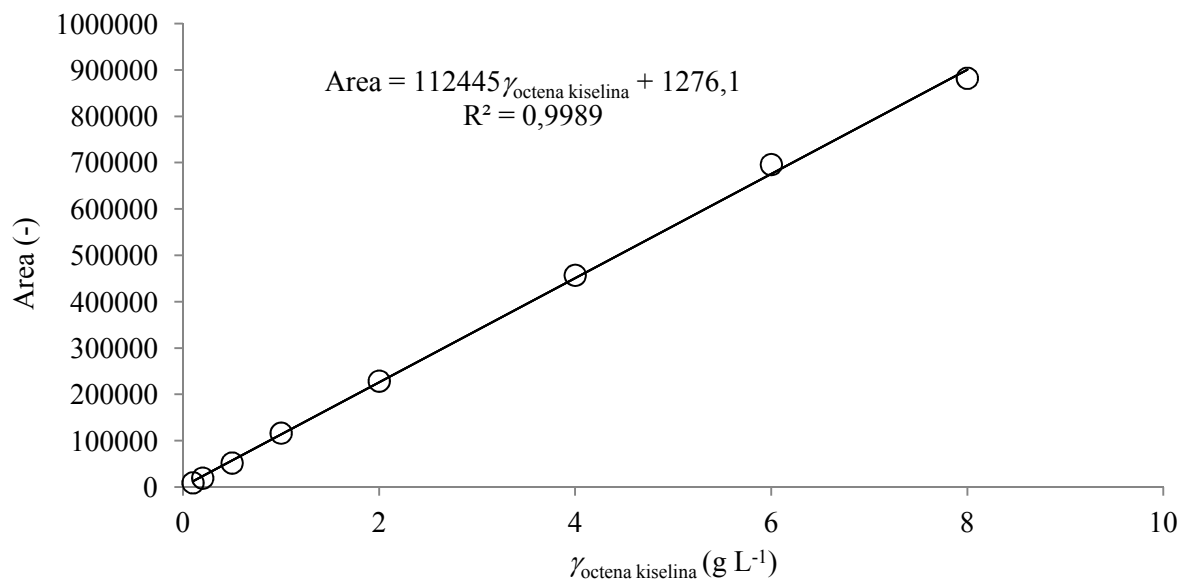
**Prilog 3.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze**Prilog 4.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije ksiloze

## 8.2. Baždarni dijagrami za određivanje koncentracija nusproizvoda

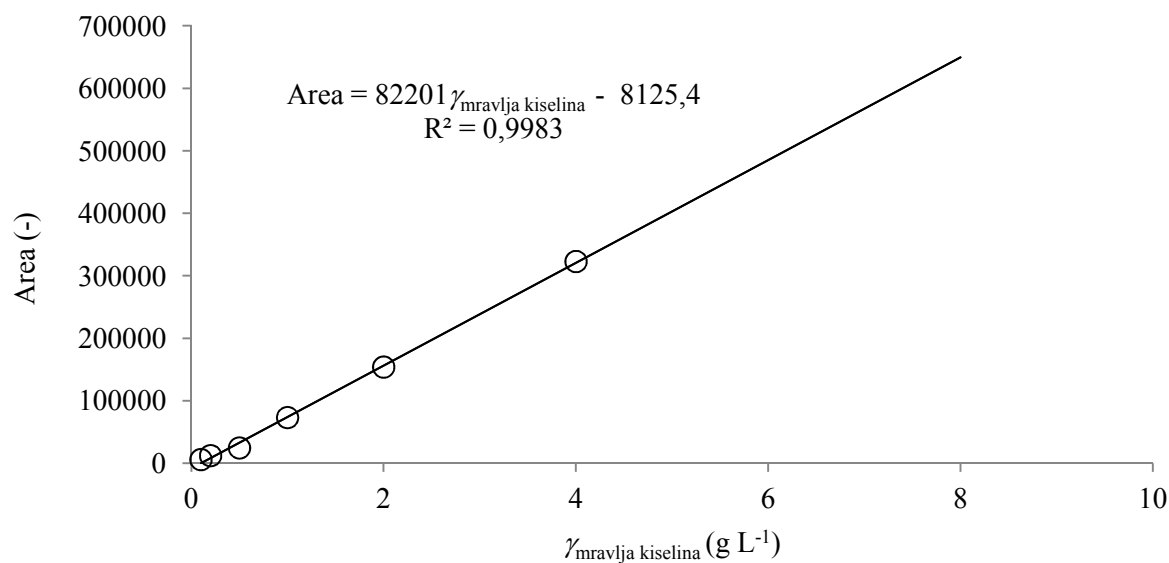
### Prilog 5. Baždarni pravac za određivanje koncentracije ukupnih furana



### Prilog 6. Baždarni pravac za određivanje koncentracije octene kiseline





**Prilog 7.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije mravlje kiseline**Prilog 8.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije levulinske kiseline