

Predobrada čipsa bukve razrijeđenom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru

Ilić, Mario

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:346792>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Mario Ilić
7393/BT

**PREDOBRADA ČIPSA BUKVE RAZRIJEĐENOM
SUMPORNOM KISELINOM U VISOKOTLAČNOM
REAKTORU**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB-SLS; šifra projekta 9717)

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

Zagreb, 2019.

Završni rad izrađen je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu u okviru HRZZ projekta „*Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina*“ (HRZZ-9717) (voditelj projekta prof. dr. sc. Božidar Šantek).

Najljepše se zahvaljujem svojoj mentorici red. prof. dr. sc. Vlatki Petravić Tominac na pruženoj stručnoj pomoći, savjetima i strpljenju.

Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Antoniji Trontel, doc. dr. sc. Mariju Novaku, mag. ing. Nenadu Marđetku, dr. sc. Martini Andlar, mag. ing. Marini Grubišić i svim drugim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na brojnim savjetima i susretljivosti tijekom izrade ovog rada. Zahvaljujem se dr. sc. Bojani Voučko i mag. ing. Karli Hanousek Čiča (Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo) te tehničkom osoblju Ljiljani Blažević, Marini Vnućec, Lidiji Drobac i Igoru Livadi na pomoći pri izradi rada.

Posebna zahvala kolegici Zori Kelemen na podršci, pomoći pri izradi rada i ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Predobrada čipsa bukve razrijeđenom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru

Mario Ilić, 0058210593

Sažetak: Otpad nastao preradom bukve jedna je od lignoceluloznih sirovina na kojima se može temeljiti razvoj budućih biotehnoloških procesa. Provedena je predobrada čipsa bukve sumpornom kiselinom (0,5% w/v) u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama (160°C, 180°C i 200°C) i vremenima zadržavanja (5, 10, 15 i 20 minuta). Hidrolizat dobiven pri optimalnim uvjetima (180°C/10 minuta) sadržavao je ksilozu s primjesama manoze i galaktoze (10,88 g/L), glukozu (2,16 g/L), arabinozu (0,49 g/L), mravlju kiselinu (0,14 g/L), octenu kiselinu (2,51 g/L) i furane (255,61 mg/L), dok levulinska kiselina pri ovim uvjetima nije detektirana. Koncentracije mravlje, octene, levulinske kiseline, furana i lignina topljivog u kiselini rasle su s povećanjem intenziteta predobrade, tj. povećanjem temperature i produženjem vremena zadržavanja.

Ključne riječi: čips bukve, kiselinska predobrada, lignocelulozni materijali, različita mjerila, visokotlačni reaktor

Rad sadrži: 48 stranica, 15 slika, 12 tablica, 74 literaturnih navoda, 1 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: mag. ing. bioproc. Marina Grubišić

Datum obrane: 18. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Brewing

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Mild-sulfuric acid pretreatment of beech chips in high-pressure reactor

Mario Ilić, 0058210593

Abstract: Waste generated by beech wood processing is one of the lignocellulosic raw materials that can be used in the development of future biotechnological processes. Pretreatment of beech chips with 0,5 % sulfuric acid in high-pressure reactor was performed at different temperatures (160°C, 180°C and 200°C) and residence times (5, 10, 15 and 20 minutes). The hydrolyzate obtained at optimal pretreatment conditions (180°C/10min) contained xylose (10,88 g/L), glucose (2,16 g/L), arabinose (0,49 g/L), formic acid (0,14 g/L), acetic acid (2,51 g/L) and furans (255,61 mg/L), while levulinic acid was not present. Concentrations of formic acid, acetic acid, levulinic acid, furan and acid-soluble lignin are higher at more intense pretreatment conditions, i.e. at higher temperatures and longer residence times.

Keywords: acid pretreatment, beech chips, different scales, high-pressure reactor, different scales, lignocellulosic materials

Thesis contain: 48 pages, 15 figures, 12 tables, 74 references, 1 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

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

Technical support and assistance: *mag. ing. bioproc. Marina Grubišić*

Defence date: September 18th 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Lignocelulozne sirovine	2
2.1.1. Kemijski sastav lignoceluloznih sirovina	3
2.1.1.1. Celuloza	4
2.1.1.2. Hemiceluloza	5
2.1.1.3. Lignin	6
2.1.1.4. Manje zastupljene komponente lignoceluloznih sirovina	7
2.1.2. Šumarski i otpad drvne industrije u Republici Hrvatskoj	8
2.1.3. Otpad bukve kao biotehnoška sirovina	8
2.1.4. Predobrada lignocelulozne sirovine	12
2.1.4.1. Fizikalna predobrada	13
2.1.4.2. Kemijske metode	14
2.1.4.3. Fizikalno-kemijske metode	14
2.1.4.4. Biološke metode	16
2.1.5. Inhibitori koji nastaju tijekom predobrade	16
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. Materijali	19
3.1.1. Sirovina	19
3.1.2. Kemikalije	20
3.2. Oprema i aparatura	20
3.2.1. Visokotlačni reaktor za termičku obradu lignoceluloznih sirovina	21
3.2.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC)	22
3.3. Metode	23
3.3.1. Predobrada lignocelulozne sirovine	23
3.3.2. Mjerenje debljine čipsa bukve	25
3.3.3. Usitnjavanje uzoraka	25
3.3.4. Ekstrakcija lignocelulozne sirovine po Soxhletu	25
3.3.4.1. Ekstrakcija vodom	25
3.3.5. Analitičke metode	27
3.3.5.1. Određivanje udjela suhe tvari i pepela u čvrstim uzorcima	27

3.3.5.2. Kiselinska hidroliza lignocelulozne sirovine	27
3.3.5.3. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini	28
3.3.5.4. Udjel lignina topljivog u kiselini (LTK)	28
3.3.5.5. Određivanje furana spektrofotometrijski	29
3.3.5.6. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC)..	29
3.3.5.6.1. Priprema uzoraka tekuće faze za analizu HPLC metodom.....	30
3.3.7. Izračunavanje iskorištenja glukana, ksilana i ukupnog lignina u lignoceluloznoj sirovini	31
4. REZULTATI I RASPRAVA	33
4.1 Kemijski sastav čipsa bukve.....	33
4.2. Kemijski sastav tekućih kiselinskih hidrolizata	35
4.3. Kemijski sastav čvrste faze dobivene kiselinskom predobradom	40
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA	43
7. PRILOZI	49
Prilog 1. Volumen tekuće faze te masa i udio suhe tvari u vlažnom čvrstom ostatku dobivenom predobradom čipsa bukve.....	49

1. UVOD

Lignocelulozne sirovine podrazumijevaju biljnu biomasu koja potječe iz raznih izvora, a to mogu biti poljoprivredni ostaci (kukuruzovina, kukuruzni oklasci, slama, suha i svježa trava), drvni ostaci nastali pri rezidbi vinograda, voćnjaka ili maslinika, šumski otpad, otpad iz drvno-prerađivačke industrije (otpad nastao pri brušenju, piljevina, strugotine, kora), otpad porijeklom iz prehrambene industrije, proizvodnje vina, šećera ili pak komunalni otpad (npr. otpadni papir, trava, lišće ili granje iz parkova i vrtova). Lignocelulozni materijal se često smatra otpadom, a biotehnološki potencijal takvih sirovina je značajan te je njihovo korištenje ekološki i ekonomski opravdano. Ova skupina biotehnoloških sirovina je jeftina i obnovljiva te može poslužiti u brojim procesima proizvodnje visokovrijednih proizvoda (Nigam i Pandey, 2009; Philippoussis, 2009; Buljubašić, 2012).

Glavne gradivne jedinice lignocelulozne biomase su celuloza (30-50%), hemiceluloza (20-40%) i lignin (15-25%), a ostali sastojci čine 5-35% sastava lignocelulozne sirovine (Palonen, 2004; Lee i sur., 2007). Celuloza i hemiceluloza se mogu razgraditi do fermentabilnih šećera koji se potom mogu koristiti za proizvodnju vrijednih biokemikalija pomoću odgovarajućih mikroorganizama. Razgradnja lignoceluloze je otežana zbog lignina koji u kombinaciji s celulozom i hemicelulozom stvara čvrstu strukturu koja je veoma otporna na vanjske utjecaje. Zbog toga je potrebna predobrada lignocelulozne sirovine kako bi se povećala poroznost i razgradljivost te reducirala kristaličnost celuloze (Zhang i sur., Mosier i sur., 2005). Kiselinska predobrada jedna je od najistraženijih i najčešće korištenih metoda predobrade lignocelulozne sirovine. Predobrada sumpornom kiselinom uzrokuje degradaciju hemiceluloze i veću enzimsku razgradljivost celuloze (Jönsson i Martin, 2016). S obzirom na to da je proces predobrade najskuplji dio biotehnološkog procesa kojem je konačan cilj proizvodnja visokovrijednih biokemikalija ili bioetanola, potrebno je razvijati nove učinkovitije postupke kojima bi proizvodnja postala ekonomski isplativija. Na taj način lignocelulozni otpad može postati češća sirovina i temelj ekološke i ekonomski prihvatljive proizvodnje vrijednih proizvoda.

Bukova šuma je najzastupljenija u Republici Hrvatskoj te je u svrhu izrade ovog završnog rada korišten je čips bukve kao biotehnološka sirovina.

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj temperature i vremena zadržavanja na uspješnost procesa predobrade čipsa bukve u visokotlačnom reaktoru uz sumpornu kiselinu kao katalizator. Postupak je proveden pri različitim temperaturama (160°C, 180°C i 200°C) uz vremenima zadržavanja od 5 do 20 minuta, ovisno o temperaturi.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Lignocelulozne sirovine

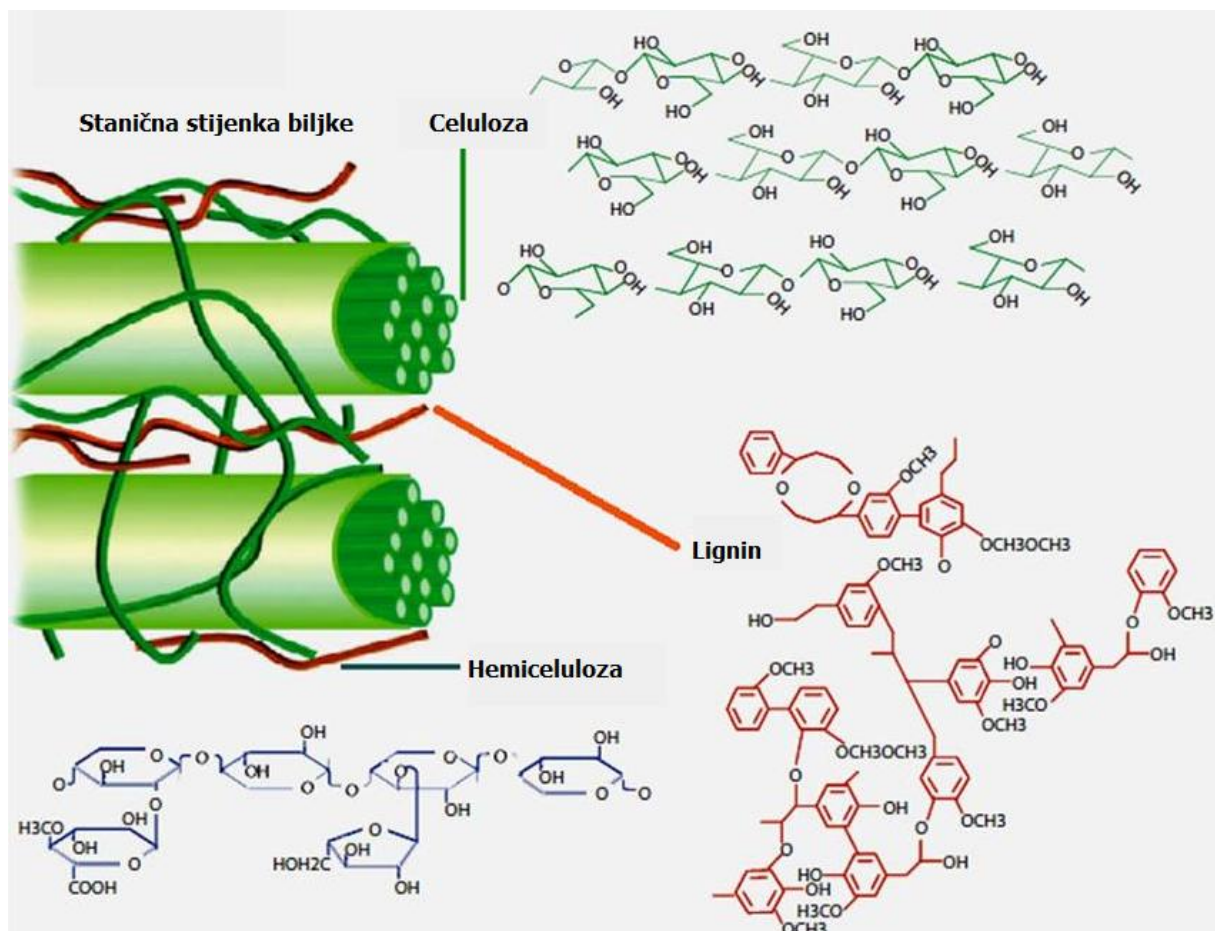
Većina organskih kemikalija proizvedeno je iz fosilnih goriva, a kao alternativa za proizvodnju tih kemikalija veoma se dobro pokazala biomasa i njeni derivati (Rass-Hansen i sur., 2007). Najobilnija i najdostupnija biomasa na svijetu je lignocelulozna biomasa te zbog obnovljivosti predstavlja veliki potencijal u proizvodnji kemikalija i goriva (Isikgor i Becer, 2015). Lignocelulozne sirovine su biomasa drvenastih i nedrvenastih biljaka, a tu pripadaju otpadni šumski materijal (piljevina, sitno granje), otpadni poljoprivredni materijal (kukuruzovina i kukuruzni oklasci, pšenična slama, slama ječma, suha i svježa trava), otpad drvnoprerađivačke industrije i otpad nastao u prehrambenoj industriji (koštice i kore voća, ostaci povrća, otpad uljarica) (Marić, 2000). Prednosti upotrebe lignoceluloznih sirovina u odnosu na šećerne i škrobne sirovine su niska cijena, laka dostupnost i široka rasprostranjenost diljem svijeta (Zhang i sur., 2012; Isikgor i Becker, 2015). Unatoč niskoj cijeni sirovine i ostalim prednostima, uporaba lignoceluloznog otpada kao sirovine u komercijalnoj proizvodnji je rijetka zbog složene strukture, otpornosti na enzimsku i kemijsku hidrolizu i nedovoljno dobro razvijenih metoda predobrade.

Tablica 1. Udio celuloze, hemiceluloze i lignina u nekim lignoceluloznim materijalima (Sun i Cheng, 2002).

Lignocelulozni materijal	Celuloza [%]	Hemiceluloza [%]	Lignin [%]
tvrdno drvo	40-55	24-40	18-25
meko drvo	45-50	25-35	25-35
slama riže	32,1	24	18
slama pšenice	30	50	15
kukuruzni oklasci	45	35	15
stabljika kukuruza	28	28	11
trava	25-40	35-50	10-30
lišće	15-20	80-85	0

2.1.1. Kemijski sastav lignoceluloznih sirovina

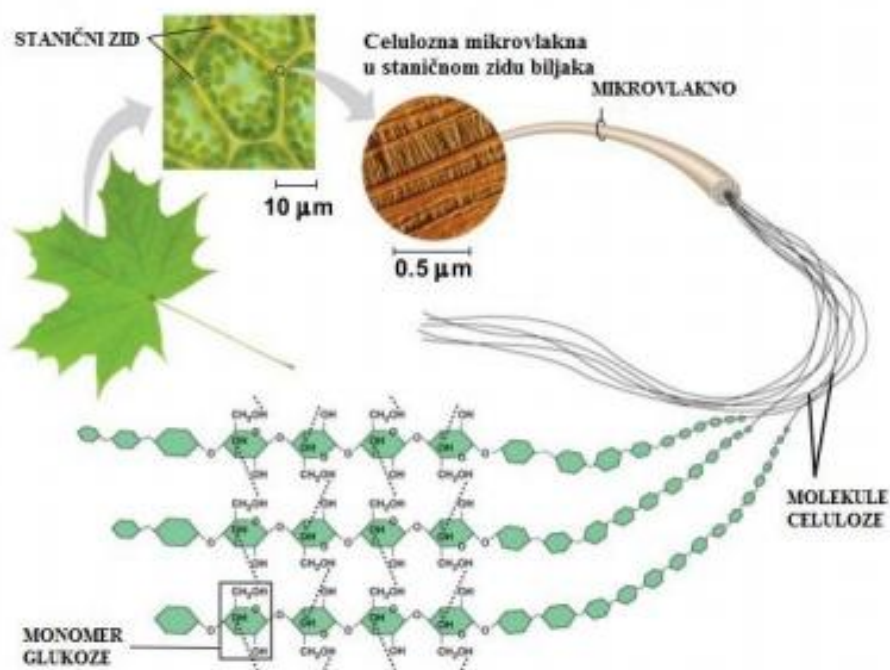
Lignoceluloza se sastoji od celuloze (30-50 %), hemiceluloze (20-40 %), lignina (15-25 %) i ostalih sastojaka (5-35 %) (Slika 1) (Palonen, 2004; Lee i sur., 2007). U biotehnološkim procesima moguća je uporaba mnogobrojnih lignoceluloznih sirovina. Kompaktnost lignocelulozi daju tri glavne komponente: razgranati lignin, linearni polisaharid celuloza i heteropolisaharid hemiceluloza. Polimeri od kojih se sastoji lignocelulozna sirovina međusobno su povezani jakim kovalentnim i slabim nekovalentnim vezama, te tvore mikrofibrile koji međusobno povezani tvore makrofibrile. Uz njih, u sastavu lignocelulozne sirovine nalazi se niz manje zastupljenih komponenata kao što su masne kiseline i njihovi esteri, proteini, terpenaska ulja te spojevi dušika fosfora i kalija u obliku anorganskih tvari (Lange, 2007). Bitno je napomenuti da zbog ekoloških i genetičkih čimbenika, udjeli navedenih komponenata nisu jednaki, već se razlikuju od sirovine do sirovine (Sluiter i sur., 2010).



Slika 1. Struktura lignocelulozne sirovine (Bamdad i sur., 2017).

2.1.1.1. Celuloza

Celuloza ($C_6H_{10}O_5$)_n je polisaharid D-glukoze i glavni sastojak drva i biljnih vlakana te čini oko 40-50% mase lignocelulozne sirovine (Pandey, 2011). U vodi i organskim otapalima je netopljiva, a tome uvelike pridonosi velik broj vodikovih veza kojima su povezane glukozne jedinice unutar lanaca. Celuloza je homopolisaharid koji se sastoji od dugih ravnih lanaca sa 7000-15000 jedinica D-glukoze (Palonen, 2004) koje su međusobno povezane β-1,4-glikozidnom vezom. Hidroksilne skupine u lancima celuloze omogućuju stvaranje vodikovih veza unutar istoga lanca celuloze (intramolekulske vodikove veze), ali i između susjednih lanaca (intermolekulske vodikove veze) zbog čega su lanci celuloze paralelno posloženi (Isikgor i Becer, 2015; Demirbaş, 2005). Njihovim povezivanjem nastaju osnovna vlakna veličine do 36 celuloznih lanaca, koja se povezuju u mikrofibrile koji su veoma otporni na bilo koji tip hidrolize. Mikrofibrili se povezuju s hemicelulozom i ligninom te uvelike utječu na otpornost, vanjske stresove, unutarnje tlakove i na mehaničku stabilnost stanične stijenke. Zbog teške dostupnosti celuloze, njeno oslobađanje u svrhu dobivanja fermentabilnih šećera često predstavlja tehnološki izazov.



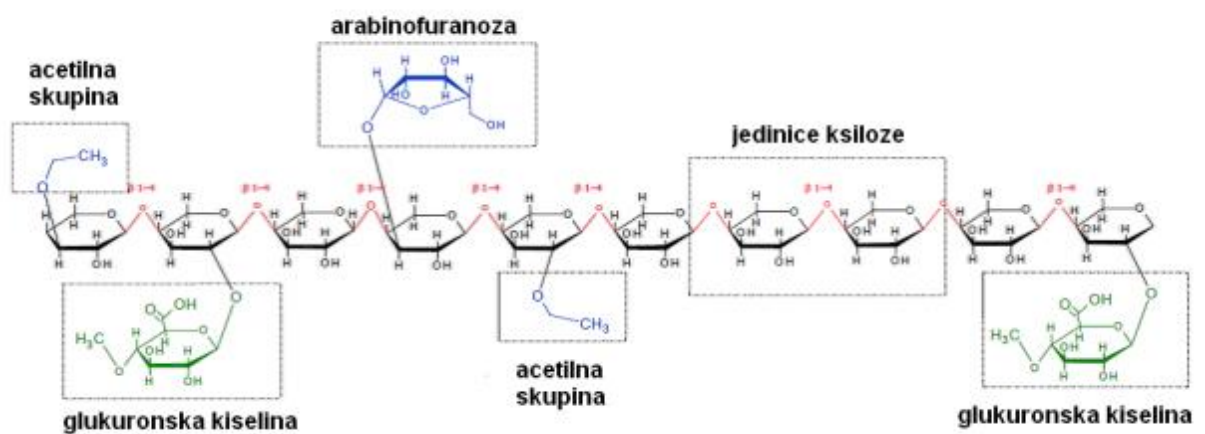
Slika 2. Struktura celuloze (Reece i sur., 2011).

2.1.1.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza je, za razliku od celuloze, heterogeni polimer u čiji sastav ulaze pentoze (ksiloza, arabinoza), heksoze (manoza, glukoza, galaktoza) i šećerne kiseline (glukuronska, metilglukuronska, galakturonska kiselina (Pandey, 2011; Demirbas, 2005).

U mekom drvu kostur izgrađuje manozu na čije se lance nadovezuju molekule galaktoze i glukoze, dok u travama i tvrdom drvu okosnicu čine lanci ksilana povezani s bočnim lancima arabinoze i glukuronske kiseline (Hames,2009). Hemiceluloza je topljivija od celuloze zbog nasumične, razgranate i manje stabilne strukture i zbog grananja čini amorfnu strukturu koja se uz pomoć kiselina hidrolizira lakše od celuloze (Beg i sur.,2001).

Hemiceluloza je pozicionirana između lignina i celuloznih vlakana koja se nalaze ispod nje, a ksilani su nasumično raspoređeni i esterski povezani s različitim mjestima u gornjem sloju lignina (Zhang, 2008). Sloj ksilana je kovalentno vezan za lignin, a nekovalentno za celulozna vlakna što ih dodatno štiti od enzimske razgradnje. Okosnicu ksilana čine jedinice D-ksilopiranoze, povezane β -1,4-glikozidnom vezom dok grupe u bočnim lancima mogu biti različite

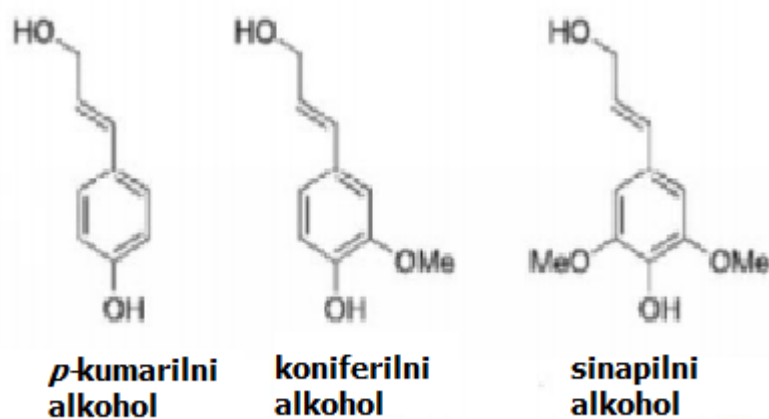


Slika 3. Struktura ksilana (Mussatto i sur., 2009).

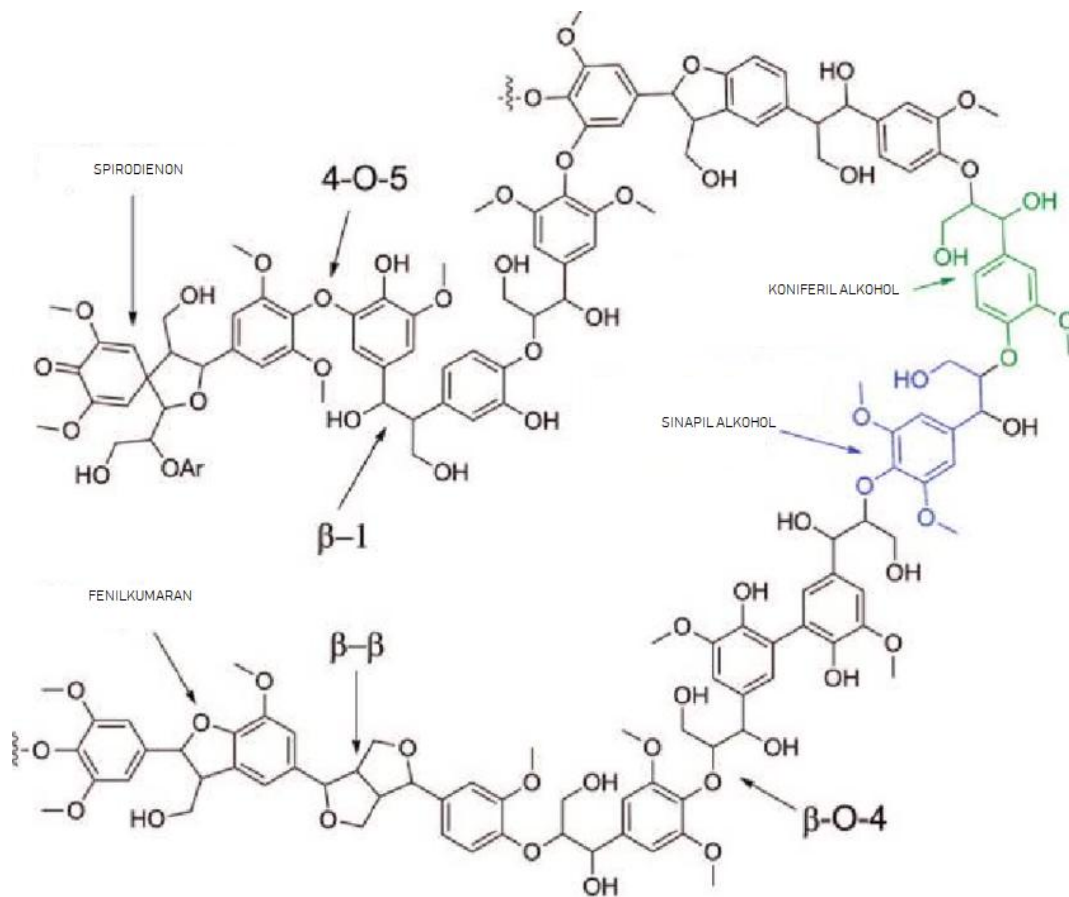
2.1.1.3. Lignin

Lignin je kompleksna trodimenzionalna makromolekula heterogenog sastava se sastoji od fenilpropanskih jedinica kao što su koniferil alkohol, kumaril alkohol i sinapil alkohol, povezani C-O ili C-C vezama (Pandey,2011). Zbog svoje kompleksne građe i heterogenog sastava vrlo je otporna na kemijsku razgradnju (Marić, 2000), a smatra se najzastupljenijim polimerom na svijetu. Biljke ga sintetiziraju nakon završenog rasta (Hames,2010), ali i prilikom nekih stresnih uvjeta kao što su izloženost patogenima, metabolički stres ili smanjena funkcija stanične stijenke (Vanholme,2010).

Tvrdo drvo i poljoprivredni ostatak sadrži manje lignina od mekog drva. Zbog zaštitne uloge koju pruža lignin, biljke s većom koncentracijom su otpornije na enzimsku razgradnju, a mogu ga razgraditi samo rodovi nekih bakterija ili gljiva (gljive bijelog truljenja) (Cohen i Hadar, 2002). Uz zaštitnu ulogu, ključan je za efikasno dobavljanje vode u biljkama , gdje svojom hidrofobnom strukturom tvori nepropusnu prepreku u staničnoj stijenci (Demirbaş,2009).



Slika 4. Prekursori pri sintezi lignina (Ratnaweera i sur., 2015).



Slika 5. Prikaz najučestalije strukture i funkcionalne grupe lignina tvrdog drveta (Zakzeski i sur., 2009).

2.1.1.4. Manje zastupljene komponente lignoceluloznih sirovina

Lignocelulozne sirovine sadrže i neke manje zastupljene komponente, a to su proteini, organske kiseline, pepeo i drugi spojevi koji ne izgrađuju osnovnu strukturu lignoceluloze (Sluiter i sur.,2010). Proteini se smatraju jedinim izvora dušika pa se iz njih određuje ukupna koncentracija dušika u biomasi (Hames, 2009).

Ekstraktivne tvari čine svi ekstracelularni spojevi i spojevi koji nisu dio trodimenzionalne strukture stanične stijenke (Hames,2009). Njihova koncentracija je relativno mala s obzirom na druge spojeve, a lako se ekstrahiraju vodom ili organskim otapalima. Ekstraktivnim tvarima smatramo smole, voskove, flavonoide, sterole, tanine, terpene, kinone, nestrukturane šećere, klorofil i druge manje molekule. Njihov udio u ukupnoj masi uzorka varira ovisno o vrsti sirovine i sezoni (Hames, 2009).

2.1.2. Šumarski i otpad drvne industrije u Republici Hrvatskoj

Šumarski otpad koji nastaje eksploatacijom i uređivanjem šuma odnosi se na granjevinu promjera manjeg od 7 cm i lisnu masu stabala te se, najvećim dijelom, ne smatra otpadom u smislu Zakona o otpadu. Procijenjena količina šumarskog otpada u Republici Hrvatskoj iznosi 0,4 milijuna tona godišnje. Drvni otpad nastaje u drvnoprerađivačkoj industriji u proizvodnji namještaja, papira i kartona, a njegova procijenjena količina iznosi oko 0,3 milijuna tona godišnje što sveukupno daje 0,7 milijuna tona godišnje (Strategija gospodarenja otpadom Republike Hrvatske, NN 178/05). Lignocelulozni materijali se često smatraju otpadom ili se tradicionalno koriste na neadekvatan način. Zbog navedenih činjenica je s ekološkog i ekonomskog stajališta opravdano razmotriti mogućnosti korištenja drvnog otpada dobivenog. Time otpad drvne industrije postaje vrijedan sekundarni proizvod koji se između ostalog može koristiti kao biotehnološka sirovina ukoliko se prethodno provede odgovarajuća predobrada. Kao drvni lignocelulozni otpad koristi se piljevina, strugotine, ostaci kore, sitno granje ali i lišće.

2.1.3. Otpad bukve kao biotehnološka sirovina

Obična bukva (*Fagus sylvatica*) je listopadno stablo iz porodice bukva (*Fagaceae*). Može narasti i do 40 metara, deblo može doseći 2 metra u promjeru, a krasi je bogata i razgranata krošnja. Kora je tanka, glatka i pepeljastosive boje, a listovi su svijetlozeleni, dugi 5-12 cm i široki 3-8 cm (Čavlović i Anić, 2009). Bukova šuma je najrasprostranjenija u Republici Hrvatskoj s visokih 36% udjela (Ištvančić i sur., 2008; Čavlović i Anić, 2009) i bukva gradi najveći broj različitih tipova šuma, kao monodominantne gorske bukove šume, pretplaninske bukove šume, mediteranske gorske bukove šume i kao mješovite bukovo-jelove šume. Udjel bukovih šuma po površini (751.459 ha) iznosi 28% ukupne šumske površine, a po drvnj zalihi (193.54 mil m³), visokih 49% ukupne drvne zalihe (Čavlović i Anić, 2009). Bukva je ujedno je i najzastupljenija u hrvatskoj drvnj industriji. Upotrebljava se kao građevno, stolarsko, kolarsko i tokarsko drvo, u proizvodnji furnira, furnirskih i stolarskih ploča, u proizvodnji lameliranog drva, za izradbu bačava, igračaka, športskih potreština, u proizvodnji celuloze i kao ogrjevno drvo (Ištvančić i sur.,2008). Zbog visoke ogrjevne vrijednosti bukve (Slika 6) drvna zaliha bukovih šuma bilježi porast nakon 2000. godine (28.7 mil m³) (Čavlović i Anić, 2009). Kada se razmotri količina piljene građe u Republici Hrvatskoj može se vidjeti da se u našim krajevima najviše obrađuje bukva (Ištvančić i sur., 2008). Shodno tome, bukove šume daju najviše lignoceluloznog otpada koji

se može primijeniti u svrhe proizvodnje biokemikalija ili bioetanola. Ovu činjenicu bi trebalo uzeti u obzir pri razvoju biotehnoloških procesa u Hrvatskoj, tako da se istraže mogući bioprocesi koji se mogu provesti na otpadu dobivenom prvenstveno uzgojem i preradom bukve, a potom i preradom ostalih vrsta stabala koja su zastupljena u Hrvatskoj.

OGRJEVNE VRIJEDNOSTI POJEDINIH VRSTA DRVA				
VRSTA DRVA		OGRJEVNA VRIJEDNOST		
		1 m ³ volumena (kWh)	po 1 m ³ složenog drva (kWh)	po 1 kg (kWh)
bjelogorično drvo	breza	2700	1900	4,3
	bukva, grab	2800	2100	4,0
	hrast	2900	2100	4,2
	jasen	2900	2100	4,2
	jablan, topola	1700	1200	4,1
	brijest	2800	1900	4,1
	vrba	2000	1400	4,1
crnogorično drvo, četinjače	smreka	2100	1500	4,5
	bor, ariš	2300	1700	4,4
	jela	2000	1400	4,5

Slika 6. Ogrjevna vrijednost pojedinih vrsta drva (Anonymous, 2015).



Slika 7. Presjek debla bukve, stablo i list bukve (Banić i Janev Hutinec, 2006).

Literaturni podaci o kemijskom sastavu bukove piljevine sumirani su u Tablici 2. Dodatni podaci o strukturi bukove piljevine koji se mogu dobiti FTIR analizama nalaze se u Tablici 3 i na Slici 8. Infracrvena spektroskopija proučava interakciju elektromagnetskog zračenja IR dijela spektra i materije. IR spektroskopija jedna je od najvažnijih metoda u identifikaciji uzoraka jer omogućava ispitivanje uzoraka na jednostavan, brz i nedestruktivan način. Ova metoda primjenjiva je za uzorke plinovite, tekuće i krute faze. Infracrveni spektrometri dostupni su na tržištu od 1940-ih, a najveći napredak svakako je bio uvođenje Fourierove transformacije čijim se matematičkim modelom uštedjelo vrijeme za dobivanje rezultata. Identifikacija strukturnih skupina određenog uzorka provodi se na temelju položaja i intenziteta apsorpcijskih vrpca. Na taj način možemo izravno dokazati postojanje određene strukturne skupine. FTIR je korisna tehnika za analizu kemijskih promjena tijekom razgradnje drveta, kao i za određivanje njegovog sastava i određivanje prisutnosti lignina u pulpi i drvetu. Također je korisna za analizu kemijskih i strukturnih promjena komponenata drveta tijekom raznih tretmana (Bođírlău i Teacă, 2009). Ova analitička metoda je pogodna zbog minimalne obrade i vrlo male količine potrebnog uzorka

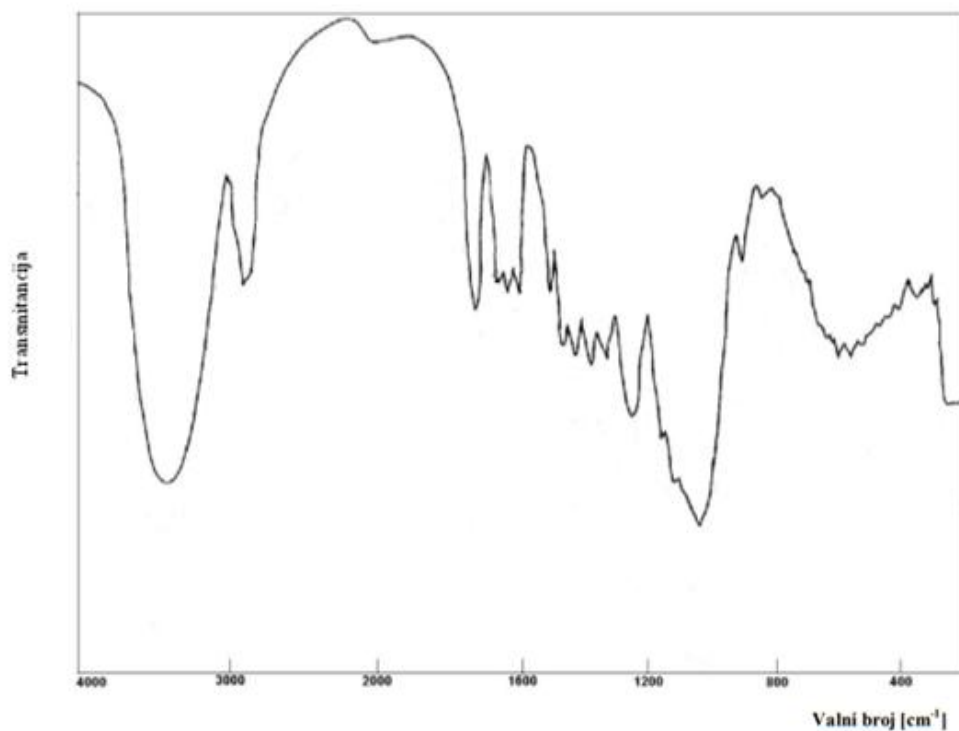
Tablica 2. Literaturni podaci o kemijskom sastavu bukove piljevine (izraženo kao % od suhe tvari u uzorku).

Celuloza	Hemiceluloza	Lignin	Pepeo	Proteini	Ekstraktivne tvari	Referenca
46,46*	48,91*	/	0,90*	1,41*	/	Mardetko, 2013
47,66	21,35	25,53	0,3	/	2,18	Bođírlău i sur. 2008
31,20	45,30	21,90	0,50	/	1,60	Demirbaş, 2004
31,80	45,80	21,90	/	2,50	2,80	Demirbaş, 2003
60,20	22,00	17,80	1.26	/	/	Kruse, 2011
45,20	32,70	22,10	/	/	1,10	Vassilev, 2012
43,63*	23,83*	24,10*	0,91*	/	7,75*	Antonović, 2007; Žegar, 2012

* izraženo kao % od mase cijelog uzorka

Tablica 3. Valni brojevi funkcijskih skupina lignocelulozne sirovine (Pandey i Pitman, 2003; Colom i sur., 2003).

Valni broj (cm^{-1})	Funkcionalna skupina
3450-3400	O-H alkohol
2930-2910	C-H metilna i metilenska skupina
1740-1730	C=O karbonilna skupina
1640-1618	C=C alken
1515-1504	C=C aromatska skupina
1462-1425	CH_2 celuloza, lignin
1384-1346	C-H celuloza, hemiceluloza
1260-1234	O-H fenolna skupina
1170-1153	O-H alkoholi (primarni i sekundarni) i alifatski eteri
910	C=C alkeni

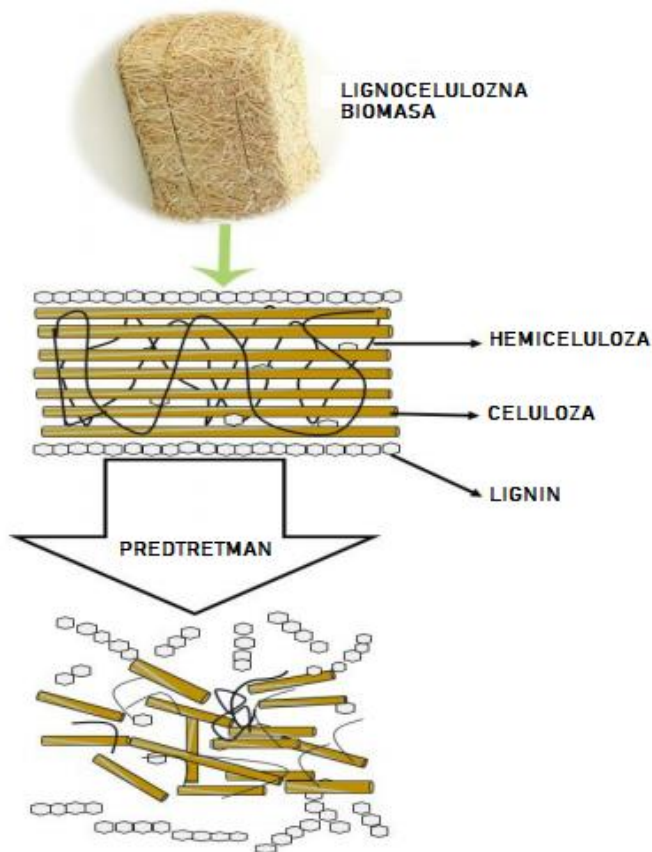


Slika 8. FT-IR spektar bukove piljevine (Pandey and Pitman 2003; Colom et al. 2003).

2.1.4. Predobrada lignocelulozne sirovine

Struktura lignocelulozne sirovine je veoma kompleksne prirode, zbog čega je potrebno provesti predobradu kako bismo osigurali veću dostupnost celuloze za njenu efikasnu hidrolizu. Predobradom želimo ukloniti hemicelulozu i lignin, smanjiti kristaličnost lignoceluloze i povećati poroznost lignoceluloznog materijala (Kumar i sur., 2009).

Metode predobrade dijelimo na fizikalne (usitnjavanje mljevenjem, piroliza, ekspanzija, ekstruzija i tretman parom), kemijske (predobrada kiselinama i lužinama, predobrada organskim otapalima ili ionskim tekućinama, ozonoliza), fizikalno-kemijske (tretman parom, hidrotermoliza i mokra oksidacija) i biološke metode (gljive truljenja i aktinomiceti) (Galbe i Zacchi, 2007; Pandey, 2011).



Slika 9. Shematski prikaz efekta predtretmana lignocelulozne biomase (Tayyab, M. i sur., 2017).

2.1.4.1. Fizikalna predobrada

Fizikalnom predobradom povećava se kontaktna površina lignocelulozne sirovine, djelomično ili u potpunosti, hemiceluloza se djelomično ili u potpunosti hidrolizira te se smanji kristaličnost celuloze (Bajpai, 2016). Manje čestice poboljšavaju razgradnju u narednim koracima procesa. Moguća su fina mljevenja koje se uglavnom koriste za analitiku te gruba mljevenja. Veličina materijala nakon usitnjavanja je od 10 do 30 mm, nakon grubog mljevenja od 0.2 do 2mm, a nakon finog mljevenja ispod 0.2 mm (npr. kriomlin). Uz to što se fizikalnim metodama predobrade slabo uklanja lignin, veliki nedostatak je utrošak energije koji je često veći od teorijski određenog sadržaja energije same lignocelulozne biomase (Galbe i Zacchi, 2007; Kumar i sur. 2009). Osim mljevenja, ovim metodama pripadaju zračenje, hidrotermalni procesi, ekspanzija, ekstruzija i druge (Tablica 4).

Tablica 4. Fizikalne metode predobrade lignoceluloznih materijala (Tahezadeh i Karimi, 2008).

Proces	Istraživana primjena	Moguće promjene u biomasi	Napomena
MLJEVENJE: kuglični mlinovi, mlinovi s valjcima, mlinovi čekićari, koloidni mlinovi, vibracijski mlinovi	Etanol	Povećanje dostupne površine i veličine pora	Velika potreba za energijom Većina ne uklanja lignin
ZRAČENJE: γ -zračenje, zračenje elektronskih zraka, mikrovalno zračenje	Etanol i bioplin	Smanjenje stupnjeva polimerizacije Smanjenje kristaliničnosti celuloze	Slaba industrijska primjena Nisu potrebne kemikalije
OSTALO: hidrotermalni procesi, parom (visoki tlak), ekspanzija, ekstruzija, piroliza	Etanol i bioplin		

2.1.4.2. Kemijske metode

Uz najčešće korištene kiselinsku i alkalnu hidrolizu, ovoj skupini kemijskih metoda pripadaju i ozonoliza, oksidativna delignifikacija i mnoge druge. Kemijske metode također povećavaju kontaktnu površinu sirovine, smanjuju stupanj polimerizacije, djelomično ili u potpunosti hidroliziraju hemicelulozu te djelomično razgrađuju lignin. Za kiselinsku metodu predobrade najčešće kiseline koje se koriste, a koje su ujedno i najistraženije su sumporna i klorovodična kiselina. Ukoliko je kiselina koncentriranija, proces se provodi pri nižim temperaturama, no velik problem predstavlja zbrinjavanje kiseline poslije predobrade. Zato se većinom provodi predobrada s razrijeđenim kiselinama koje nije nužno reciklirati, no zato se predobrada odvija pri višim temperaturama (140-200°C) uz određeno vrijeme zadržavanja. Najčešće se koristi sumporna kiselina koncentracije do 4%, pri čemu se hemiceluloze razgradi više od celuloze (Lenihan i sur., 2009). Nedostatak predtretmana s razrijeđenom kiselinom je nastajanje toksičnih spojeva proporcionalno povećanju temperature i vremena zadržavanja (Hu i sur., 2010). Uz to, nakon predtretmana potrebno je neutralizirati suspenziju lignocelulozne sirovine što je dodatni financijski izdatak i povećani trošak proizvodnje. U usporedbi s drugim metodama, alkalna predobrada se provodi lužinama uz niže temperature i niže tlakove. Razlika je ipak u vremenu trajanja koje je znatno produženo; od nekoliko sati pa do nekoliko dana. . Alkalnom predobradom postiže se bolja delignifikacija lignoceluloznih materijala. Povećava se kontaktna površina sirovine, smanjuje se stupanj polimerizacije, a hidroliza esterske veze u hemicelulozi povećava poroznost sirovine. Stupanj degradacije je manji, ali zato nastaje manje inhibitora. Što se tiče organskih otapala, najčešća su metanol, etanol, aceton, etilenglikol, trietilenglikol i fenol (Kumar i sur.,2009).

2.1.4.3. Fizikalno-kemijske metode

Ova skupina obuhvaća metode između fizikalnih i kemijskih metoda, ili njihovu kombinaciju. Jedna od najčešćih metoda je eksplozija vodenom parom kojom se lignocelulozna biomasa izlaže zasićenoj pari visokoga tlaka kroz nekoliko sekundi do nekoliko minuta (temperature od 160 do 260°C i tlakovi od 0,69 do 4,83 MPa) nakon čega se materijal izlaže atmosferskom tlaku uslijed čega dolazi do eksplozivne dekompresije materijala (Kumar i sur., 2009; Galbe i Zacchi, 2007). Time dolazi do degradacije hemiceluloze kiselinama oslobođenim tijekom predtretmana i transformacije lignina uslijed djelovanja visoke temperature. Glavni nedostaci ovih metoda su nepotpuno uklanjanje

lignina i nastajanje inhibitora fermentacije, dok su glavne prednosti niža potrošnja energije u usporedbi s fizikalnim metodama i minimalna nužna primjena kemikalija (Barrett i sur., 2009).

Tablica 5. Kemijske i fizikalno-kemijske metode predobrade (Taherzadeh i Karimi, 2008).

Proces	Istraživana primjena	Moguće promjene u biomasi	Napomena
EKSPLOZIJA: parna eksplozija, eksplozija u tekućem amonijaku (eng. ammonia fiber explosion, AFEX), eksplozija u CO ₂ , eksplozija u SO ₂	Etanol i bioplin		
ALKALNI: natrijev hidroksid, amonijak, amonijev sulfit	Etanol i bioplin	Povećanje dostupne površine Djelomična ili skoro potpuna delignifikacija	Ove metode su među najefikasnijima i najviše obećavaju za industrijsku primjenu
KISELINSKI: sumporna kiselina, klorovodišna kiselina, fosforna kiselina	Etanol i bioplin	Smanjenje kristaliničnosti celuloze	Relativno brze
PLINSKI: kloov dioksid (ClO ₂), dušikov dioksid (NO ₂), fosforna kiselina	Etanol i bioplin	Smanjenje stupnjeva polimerizacije Djelomična ili skoro potpuna hidroliza hemiceluloze	Zahtijevaju ekstremne uvjete Potreba za kemikalijama
OKSIDIRAJUĆI AGENSI vodikov peroksid, vlažna oksidacija, ozon	Etanol i bioplin		
EKSTRAKCIJA LIGNINA OTAPALIMA etanol-voda, benzen-voda, etilen-glikol, sredstva za bubrenje	Etanol		

2.1.4.4. Biološke metode

Biološku predobradu provode mikroorganizmi koji imaju sposobnost degradacije lignina (gljive truljenja i aktinomicete). Metoda je ekološki prihvatljiva zbog male potrebe za energijom, jednostavnije opreme i jer nije nužna uporaba kemikalija. Nedostatak je taj što se mikroorganizmi hrane razgradnim produktima hemiceluloze i celuloze što u konačnici daje smanjenu iskoristivost procesa. Metodama genetičkog inženjerstva nastoji se modificirati ove tipove gljiva s ciljem sprječavanja neželjene razgradnje celuloze i hemiceluloze (Carrere i sur., 2015). Gljive bijelog truljenja smatraju se najboljima u razgradnji lignoceluloznih sirovina (Fan, 2011), koja se odvija pomoću specifičnih lakaza i peroksidaze.

Tablica 6. Biološke metode predobrade (Taherzadeh i Karimi, 2008).

Proces	Istraživana primjena	Moguće promjene u biomasi	Napomena
Fungi i aktinomiceti	Etanol i bioplin	Delignifikacija Smanjenje stupnja polimerizacije celuloze Djelomična hidroliza hemiceluloze	Mala potreba za energijom Nisu potrebne kemikalije Blagi uvjeti Vrlo spora obrada Ne razmatraju se za komercijalnu primjenu

2.1.5. Inhibitori koji nastaju tijekom predobrade

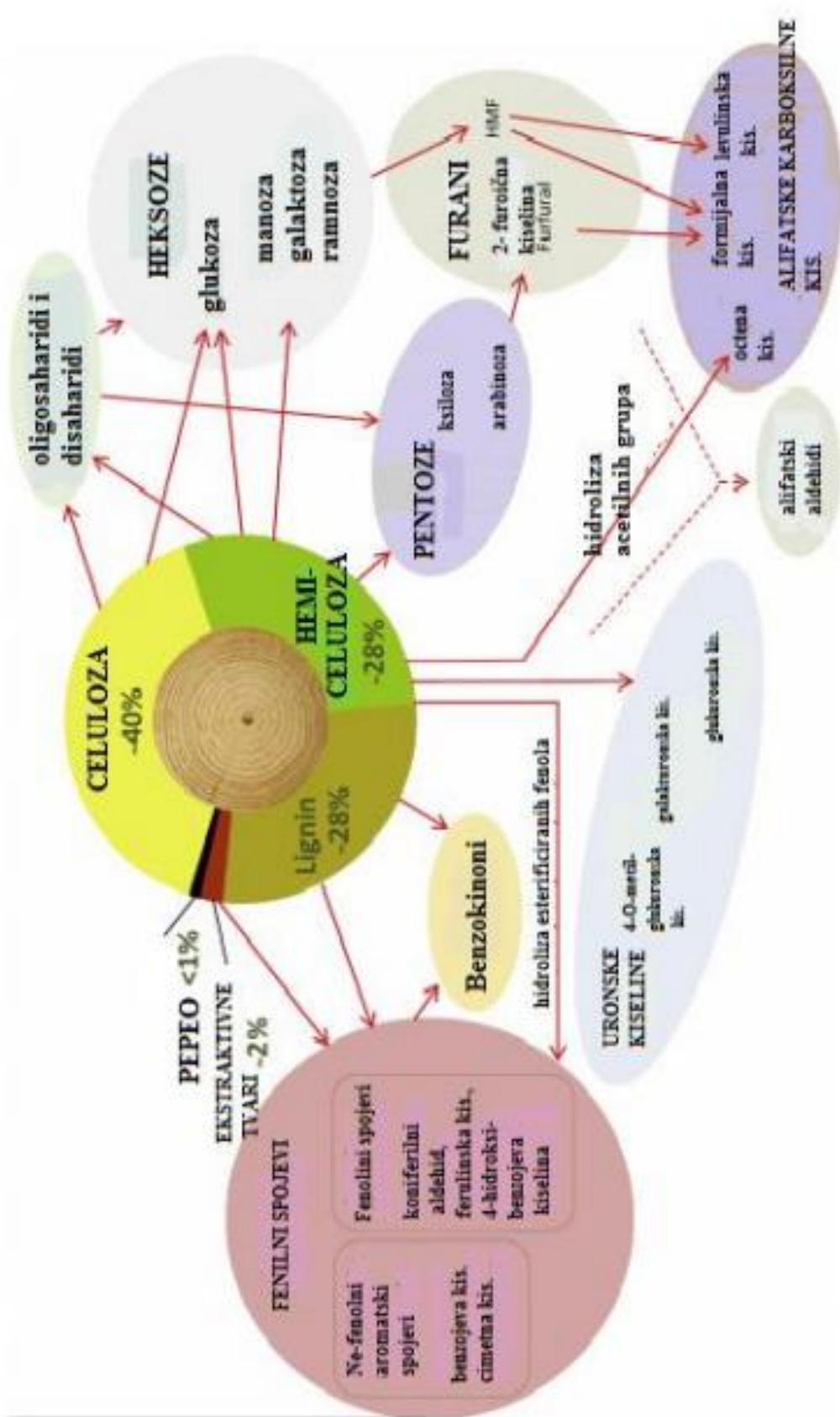
Nastajanju inhibitora pogoduje viša temperatura, a karakterizira ih inhibicijsko djelovanje na celulolitičke enzime i na rast proizvodnog mikroorganizma. Mogu se podijeliti u tri skupine:

- 1.komponente prisutne u strukturi lignoceluloznih sirovina,
- 2.komponente nastale degradacijom lignoceluloznih sirovina,
3. komponente prisutne na lignoceluloznim sirovinama (Harmsen i sur., 2013).

Što se tiče prve skupine, degradacijom polimera do monomernih jedinica dolazi do oslobađanja inhibicijskih spojeva kao što su aldehidi i fenolni spojevi. Iz hemiceluloze se oslobađaju različite kiseline (octena, glukuronska i galakturonska) koje također mogu djelovati inhibirajuće (Harmsen i sur.,2013).

Najzastupljeniji su inhibitori druge skupine, a to su: furan aldehidi, fenolni spojevi, karboksilne kiseline i derivati lignina. Kiselinskom predobradom nastaju furfurali degradacijom pentoza, a degradacijom heksoza nastaje 5-hidroksimetilfurfural (HMF). 5-hidroksimetilfurfural se daljnjim izlaganjem velikim temperaturama i velikim koncentracijama kiseline degradira do mravlje i levulinske kiseline, a furfural do furoične i mravlje kiseline (Harmsen i sur.,2013; Jönsson i Martin, 2015).

Treću kategoriju inhibitora čine komponente koje nisu dio njene strukture lignocelulozne sirovine, ali su prisutne na njoj. Tu su česti dušikovi i sumporni spojevi koje potječu od zagađenog okoliša u kojem se nalazi lignocelulozna sirovina (Harmsen i sur., 2013).



Slika 10. Nastajanje inhibitora degradacijom lignocelulozne biomase (preuzeto od: Jönsson i Martin, 2015.)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Sirovina

Lignocelulozna sirovina korištena u ovom radu je čips bukve (Slika 1) koji je dobiven s područja sjeverozapadne Hrvatske. Nakon primitka, sirovina je u tankom sloju raširena radi sušenja i ostavljena dva tjedna pri sobnoj temperaturi. Pritom je povremeno provedeno njezino miješanje i prevrtanje.



Slika 11. Izgled čipsa bukve korištenog u provedenim eksperimentima (vlastita fotografija.)

3.1.2. Kemikalije

Kemikalije korištene u ovom radu navedene su u Tablici 2.

Tablica 7. Kemikalije korištene u istraživanju

Naziv	Proizvođač
Sumporna kiselina	Acros Organics, Belgija
Fosfatna kiselina	Fluka, Njemačka
Demineralizirana voda	Vlastito postrojenje za demineralizaciju vode
Cinkov sulfat heptahidrat	Merck, Njemačka
Kalcijev hidroksid	Kemika, Hrvatska
Furfural	Sigma-Aldrich, Njemačka

Prije pristupanja analizi sirovine, za uklanjanje ekstraktivnih tvari topljivih u vodi korištena je demineralizirana voda iz vlastitog postrojenja, dok su preostale ekstraktivne tvari izdvojene pomoću etanola volumnog udjela 96% (Medika, Hrvatska).

3.2. Oprema

- Vage
 - digitalna vaga Acculab ALC-210.4 (Max. 210 g, d=0.1mg), Sartorius, Njemačka
 - tehnička vaga Tehtnica ET-1111, Slovenija
- Mufolna peć
 - mufolna peć model Heraew
 - mufolna peć Iskraterm IP-08
- Termostat

Korišten je termostat „Sutjeska“ i ST-05, Instrumetaria, Hrvatska

- Za ekstrakciju vodom i etanolom

- Aparatura po Soxhlet-u s odgovarajućim grijačem (Inako, Zagreb, Hrvatska), TIP: SK_{2KS}, Br: 8734, V: 220, W: 800) i celulozni tuljci za ekstrakciju MN 645 30/33 × 90 mm (Macherey-Nagel GmbH Co KG, Njemačka)
- Rotacijski-vakuum uparivač
- Rotavapor Büchi R-215 124 (BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska) s vakuum kontrolerom V-850, vakuum pumpom V-700 i vodenom kupelji (Heating Bath B-49)
- UV/Vis spektrofotometar

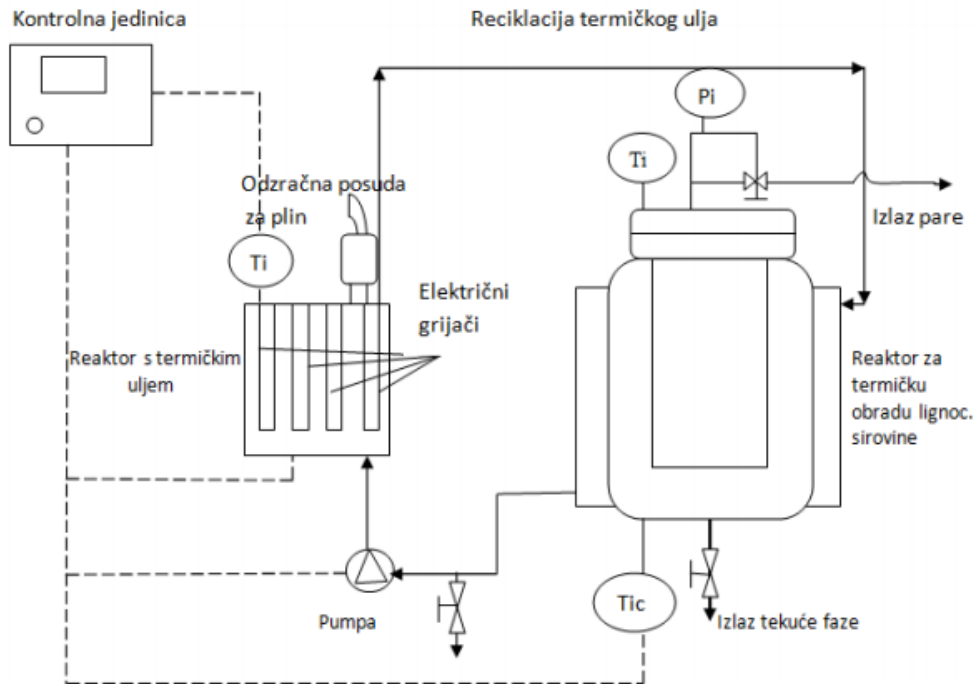
Korišten je uređaj Cary Series, UV-VIS Spectrophotometer; Agilent Technologies, SAD, a mjerenja su provedena u kvarcnim kivetama promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka).

- Za usitnjavanje čvrstih uzorka
- Mlinac za kavu SCG 3050SS Sencor, Japan
- CryoMill (Retsch, Njemačka)
- Za čuvanje uzoraka

Korišteni su hladnjak i zamrzivač tvrtke Bosch (Njemačka).

3.2.1. Visokotlačni reaktor za termičku obradu lignoceluloznih sirovina

Za obradu lignocelulozne sirovine razrijeđenom sumpornom kiselinom korišten je visokotlačni reaktor prikazan na Slici 12. U reaktoru ukupnog volumena 20 litara nalazi se perforirana košara u koju se stavlja lignocelulozna sirovina. Reaktor se grije preko plašta kroz koji struji termičko ulje koje se grije u odvojenoj posudi uz pomoć tri električna grijača. Integrirana pumpa omogućava strujanje zagrijanog ulja kroz cijeli sustav uz jednolično zagrijavanje smjese preko plašta reaktora. Reaktor sadrži temperaturne sonde za određivanje temperature ulja za grijanje, te temperaturne sonde za određivanje temperature u gornjem i donjem dijelu reaktora i tlaka u gornjem dijelu reaktora (tlak para). Nakon završetka procesa postepeno se ispušta para iz reaktora otvaranjem ventila za paru, a kada se tlak u reaktoru izjednači s atmosferskim tlakom otvara se ventil na dnu reaktora za ispuštanje tekućeg dijela hidrolizata. Čvrsti dio zaostaje u perforiranoj košari koja se može izvaditi nakon otvaranja poklopca reaktora.



Slika 12. Shema visokotlačnog reaktora za obradu lignoceluloznih sirovina (Ti- temp. pare/ulja; Pi-tlak pare u reaktoru; Tic- temperatura unutar reaktora)

3.2.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (HPLC)

Korišten je za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti (eng. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) (Slika 13) Shimadzu CLASS- VP LC-10A (Shimadzu, Japan). Ovaj uređaj sastoji se od crpke (LC-10 ADVP), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10ADVP), uređaja za grijanje kolone (CTO-10AVP), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel H Guard Column, Sigma), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10AVP) i računalnog programa za kromatografiju.

Za filtraciju uzoraka (tekuća faza nakon predobrade sirovine i hidrolizati sirovine i čvrste faze dobivene predobradom) korišteni su najlonski filtri (LLG-Syringe filters SpherosNylon, 0.22 μm /25 mm; LLG Labware).



Slika 13. HPLC- uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti.

3.3. Metode

3.3.1. Predobrada lignocelulozne sirovine

Kiselinska predobrada sirovine razrijeđenom sumpornom kiselinom provedena je u visokotlačnom reaktoru (Slika 12).

Pritom je eksperiment postavljen tako da je početni omjer čvrste i tekuće faze (eng. solid-to-liquid ratio, SLR) iznosio 1:16,818 (što znači 1 g suhe tvari sirovine na 16,818 mL razrijeđene kiseline odnosno 0,06 g suhe tvari sirovine na 1 mL razrijeđene kiseline). Izraženo na drugi način, kao omjer tekuće i čvrste faze (eng. liquid-to-solid ratio, LSR) to je 16,818:1 (odnosno 16,818 mL razrijeđene kiseline na 1 g suhe tvari sirovine). Odvagano je 556 g suhe tvari, što odgovara masi od 594,6 g bukve (koja sadrži 93,52 % suhe tvari) i stavljeno u košaru reaktora.

Sirovini je dodano 10 L prethodno pripravljene razrijeđene sumporne kiseline (0,5 % w/v), koja je sadržavala ukupno 9971 L vodovodne vode i 28,3 mL koncentrirane sumporne kiseline. Radi lakšeg rukovanja velikim volumenom tekućine, prije ulijevanja u reaktor je razrijeđena kiselina pripravljena u dva obroka od 5L, tako da je u 4986 mL vodovodne vode dodano je po 14,15 L koncentrirane sumporne kiseline. Predtretmani (Tablica 8) su

provedeni pri temperaturama 160°C i 200°C uz vrijeme zadržavanja od 5 i 10 minuta, a pri temperaturi od 180°C istaržena su vremena zadržavanja od 5, 10, 15 i 20 minuta.

Tablica 8. Plan eksperimenta predobrade čipsa bukve u visokotlačnom reaktoru razrijeđenom sumpornom kiselinom (0,5 % w/v).

		Temperatura zagrijavanja [°C]		
		160	180	200
Vrijeme zadržavanja [min]	5	+	+	+
	10	+	+	+
	15	-	+	-
	20	-	+	-

Nakon postizanja željene temperature predobrade i isteka ispitivanog vremena zadržavanja, postupno je ispuštena je para dok nije tlak u reaktoru izjednačen s atmosferskim tlakom. Potom je tekuća faza ispuštena u prihvatnu posudu, a poklopac reaktora je otvoren. Osim tekuće faze, na dnu prihvatne posude se nalazio i dio čvrste faze koja je prošla kroz perforaciju košare (taj dio čvrste faze smatra se gubitkom).

Staklenom menzuri od 2 L izmjeren je volumen tekuće faze. Pritom je tekuća faza odvojena od čvrste faze. Uzet je uzorak bistre tekuće faze u tri polipropilenske Falcon kivete od 50 mL. Kratko nakon provođenja procesa određena je koncentracija topljivog lignina (TL) i ukupnih furana u tekućoj fazi, a ostatak uzorka je zamrznut za kasniju analizu šećera i inhibitora kako je opisano u Poglavlju 3.3.2.9. U plastične boce pohranjeno je oko 2,75 L tekuće faze i ostavljeno bez neutralizacije na sobnoj temperaturi za kasnije eksperimente fermentacije. Ostatak tekuće faze je odbačen.

Čvrsta faza dobivena obradom sirovine izvađena je iz košare i ohlađena u tankom sloju na aluminijskoj foliji, a zatim je odvagana. Masa od 20 do 30 g čvrste faze odvojena za analizu i odvagana na analitičkoj vagi, isprana vrućom vodom na Büchnerovom lijevku do neutralne reakcije, a potom je prebačena u papirnate lađice i osušena u sušioniku. Usitnjena je u mlincu za kavu ili pomoću kriomlina i potom je korištena za dvostupanjsku hidrolizu koja prethodi određivanju šećera te topljivog i netopljivog lignina. Izračunata je suha tvar u uzetom uzorku, te ukupna suha tvar čvrste faze preostale u košari. Ostatak čvrste faze nakon hlađenja i vaganja prebačen je u vrećice bez prethodne neutralizacije i zamrznut u manjim obrocima radi kasnijih istraživanja.

3.3.2. Mjerenje debljine čipsa bukve

Pomičnom mjerkom izmjerena je debljina 50 komadića čipsa bukve. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost i standardna devijacija te najmanja i najveća debljina.

3.3.3. Usitnjavanje uzoraka

Uzorci čipsa bukve i čvrste faze dobivene kiselinskom predobradom usitnjavani su u dva koraka i to najprije pomoću mlinca za kavu, a potom pomoću kriomlina kako bi se dobile čestice veličine do 1 mm. Ovako samljeveni uzorci su ručno prosijani kroz sito veličine 1 mm. Nakon toga se pristupilo kemijskim analizama.

3.3.4. Ekstrakcija lignocelulozne sirovine po Soxhletu

Prije analize lignina i šećera uzorci sirovine (čips bukve) podvrgnuti su najprije vodenoj, pa potom i etanolnoj ekstrakciji u aparaturi po Soxhletu, u skladu sa standardnim metodama za određivanje sastava biomase koje preporučuje NREL (Sluiter i sur., 2005b; NREL, 2015). Pritom su primijenjeni ekstrakcijski uvjeti koje je za kukuruzne oklaske optimirala Korunek (2015), što znači 8 sati vodene ekstrakcije i 24 sata etanolne ekstrakcije. Uzorci za ekstrakciju, koji su sadržavali manje od 10% vlage, usitnjeni su do odgovarajućih dimenzija čestica i odvagani su u brojevima označene celulozne tuljce za ekstrakciju, a na vrh je stavljena vata. Da bi kasnije što točnije preračunali rezultate, vaganje je provedeno istodobno kad i analiza suhe tvari. U 4 tuljca za ekstrakciju odvagan je uzorak sirovine na 4 decimale (oko 6,5 g uzorka izvorne sirovine usitnjene u kriomlinu). Pritom se pazilo da tuljci budu napunjeni do polovice ili manje i uzeto je u obzir bubrenje (tako da visina uzorka u tuljcima bude ispod razine preljevne cijevi).

3.3.4.1 Ekstrakcija vodom

U prihvatnu tikvicu za ekstrakciju dodano je 190 mL destilirane vode, uključen je grijač i puštena je voda kroz hladilo. Vrijeme ekstrakcije (8 h) je mjereno od početka vrenja. Nakon 8 h ekstrakcija je prekinuta te su nakon hlađenja na sobnu temperaturu privremeno izvađeni tuljci da bi se u potpunosti iz aparature uklonio vodeni ekstrakt. Cjelokupni vodeni ekstrakt je prebačen u odmjernu tikvicu od 200 mL, pri čemu se pazilo da se aparatura ispere destiliranom vodom koja je također prebačena u odmjernu tikvicu.

Odmjerna tikvica je dopunjena do oznake, a od dobivenih 200 mL razrijeđenog ekstrakta uzeto je 3 puta po 10 mL za određivanje masenog udjela i masene koncentracije suhe tvari u vodenom ekstraktu. Tri Petrijeve zdjelice su osušene (105 °C/2h), ohlađene u eksikatoru i odvagane, a potom je u svaku od njih dodano po 10 mL vodenog ekstrakta koji je također odvagan. Otvorene Petrijeve zdjelice su stavljene na nekoliko sati u termostat da bi pri temperaturi oko 80 °C isparila sva voda. Potom su uzorci do kraja osušeni (105 °C/2h), ohlađeni u eksikatoru i izvagani. Iz mase ekstrakta izračunati su maseni udio i masena koncentracija ekstrakta u otopini. Iz masene koncentracije ekstrakta i ukupnog volumena ekstrakta (200 mL) izračunata je masa ukupnog ekstrakta izdvojenog iz odvaganog uzorka. Ona je dalje preračunata u maseni udio vodenog ekstrakta sirovini, koji je izražen na suhu tvar i na polaznu masu sirovine. Nakon izdvajanja vodenog ekstrakta, tuljci su vraćeni na isto mjesto u aparaturu kako bi se mogla nastaviti ekstrakcija etanolom.

3.3.4.2. Ekstrakcija etanolom

U aparaturu u koju su vraćeni tuljci s uzorcima dodano je 190 mL etanola (96 % v/v) i provedena je ekstrakcija u trajanju 24 h. Nakon toga aparatura je ostavljena da se hladi do sobne temperature te je iz ohlađenog ekstraktora izvađen uzorak, a cijeli ekstrahirani materijal je prebačen na celulozni filter papir u Büchnerov-om lijevku. Nakon odvajanja tekuće faze čvrsti materijal je ispran sa 100 mL svježeg etanola (96 % v/v) i ostavljen da se osuši na Büchnerov-om lijevku i da vakuum povuče što je više moguće ekstrakta iz čvrstog uzorka. Filtrat dobiven ispiranjem spojen je s ekstraktom iz prihvatne tikvice.

Sav alkoholni ekstrakt iz ekstraktora i filtrata s Buchnerovog lijevka prebačeni su zajedno u posebnu tikvicu (50 mL) namijenjenu za korištenje na rotacijskom vakuum-uparivaču koji je primijenjen za uklanjanje etanola iz alkoholnih ekstrakata. Temperatura vodene kupelji rotacijskog vakuum-uparivača bila je pritom podešena na 40 ± 5 °C. Tijekom upravljanja bilo je potrebno iznimno paziti na uvjete rada (temperatura i vakuum) jer je dolazilo do jakog pjenjenja. Kad se volumen u tikvici dovoljno smanjio, sadržaj je prebačen u manju tariranu tikvicu (50 – 100 mL) u kojoj je uparavanje provedeno do kraja. Nakon uparavanja tikvica je stavljena na sušenje pri 40 ± 2 °C tijekom 24 sata. Nakon toga je ohlađena na sobnu temperaturu u eksikatoru i izvagana na 4 decimale. Izračunat je udio etanolnog ekstrakta izdvojenog nakon različitih vremena ekstrakcije i izražen na suhu tvar i na polazni uzorak. Nakon ekstrakcije etanolom, čvrsti uzorak se može sušiti na zraku (ili eventualno pri 45 °C). Osušeni materijal ekstrahiran etanolom spremljen je u odgovarajuće bočice i kasnije korišten za analize.

3.3.5. Analitičke metode

Udio suhe tvari i pepela određeni su u sirovini i čvrstoj fazi nakon predobrade. Uspoređeni su udjeil polisaharida te topljivog i netopljivog lignina u općetnoj sirovini i u čvrstoj fazi nakon predobrade razrijeđenom sumpornom kiselinom.

3.3.5.1. Određivanje udjela suhe tvari i pepela u čvrstim uzorcima

Analiza suhe tvari i pepela provedena je za svaki uzorak u tri paralele (Mousdale, 1997; Sluiter i sur., 2008).

Udio pepela u čvrstim uzorcima određen je tako da su porculanski lončići najprije žareni u mufolnoj peći (550 °C/ 5 h), ohlađeni u eksikatoru i odvagani na 4 decimale. Zatim je u njih odvagano oko 1 g uzorka, koji je potom osušen pri 105 °C do konstantne mase, ohlađen u eksikatoru i odvagan. Iz razlike masa izračunat je udio suhe tvari.

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

Odvagani uzorci u lončićima su zatim karbonizirani na plameniku, a potom žareni u mufolnoj peći (550 °C/ 5 h) do bijelog pepela te ohlađeni u eksikatoru i izvagani. Postotak pepela u uzorku izražen je na cjelokupni uzorak te na suhu tvar.

3.3.5.2. Kiselinska hidroliza lignocelulozne sirovine

Udjel strukturnih ugljikohidrata (glukan, ksilan s primjesama manana, galaktana i arabinan) te lignina topljivog i netopljivog u kiselini određeni su u izvornoj, ekstrahiranoj i predobrađenoj lignoceluloznoj sirovini kiselinskom hidrolizom prema propisu Nacionalnog laboratorija za obnovljive izvore energije (eng. National Renewable Energy Laboratory, NREL; Sluiter i sur., 2010). U tikvicu s okruglim dnom je dodano oko 0,4 g ispranog, osušenog uzorka koji je prethodno usitnjen u fini prah pomoću mlinca za kavu ili kriomlina. Zatim je dodano 4 mL H₂SO₄ (72% w/v) i sirovina je ostavljena u termostatu na 30 °C sat vremena uz povremeno miješanje sadržaja staklenim štapićem. Potom je dodano 112 mL demineralizirane vode tako da je koncentracija sumporne kiseline u smjesi nakon dodatka vode iznosila 4 %. Smjesa je zagrijana do vrenja i kuhana kroz 4 sata uz povratno hladilo i povremeno miješanje. Nakon hidrolize uzorci su ohlađeni pod mlazom vode i filtrirani preko Büchnerovog lijevka kroz prethodno osušeni i izvagani filter papir, a volumen filtrata je izmjeren menzutom. Zaostali talog ispiran je s vrućom vodom do neutralne pH-vrijednosti.

Čvrsti talog zaostao na filter papiru sadrži lignin netopljiv u kiselini s pepelom. Čija masa je određena gravimetrijski nakon sušenja pri 105 °C u prethodno odvaganim Petrijevim zdjelicama. Udio lignina topljivog u kiselini u filtratu određen je spektrofotometrijski neposredno nakon hidrolize. Ostatak filtrata je zamrznut (u jednoj Falcon kiveti od 50 mL i 3 Falcon kivete od 15 mL), a nakon odmrzavanja je korišten za analizu glukoze, ksiloze s primjesama manoze i galaktoze te inhibitora (octena kiselina, mravlja kiselina, levulinska kiselina) HPLC metodom uz prethodnu odgovarajuću pripremu uzoraka. Iz dobivenih koncentracija monosaharida (glukoze i ksiloze s primjesama manoze i galaktoze) izračunat je udio strukturnih ugljikohidrata (glukana i ksilana primjesama manana i galaktana).

3.3.5.3. Određivanje udjela lignina netopljivog u kiselini

Čvrsti dio sirovine zaostao na filter papiru nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize osušen je u prethodno odvaganoj Petrijevoj zdjelici pri 105 °C do konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru i vaganja izračunat je udjel lignina netopljivog u kiselini s pepelom prema jednadžbi **[1]**. Pritom je u jednadžbi umjesto 0,4 g uvrštena točna odvaga svakog uzorka.

$$w(\text{LNTK}) = \frac{m(\text{osušeni filter s talogom}) \cdot m(\text{filter})}{m(\text{uzorka uzetog u analizu})} \cdot 100[\%] \quad \mathbf{[1]}$$

Filtri s netopljivim ligninom prebačeni su u prethodno žarene i odvagane porculanske lončice, spaljeni na plameniku i žareni u mufolnoj peći (550 °C/ 5 h). Pomoću izračunate mase pepela napravljena je korekcija i izračunat udio netopljivog lignina.

3.3.5.4. Udjel lignina topljivog u kiselini (LTK)

U filtratu kiselinskog hidrolizata određen je udjel lignina topljivog u kiselini (eng. acid soluble lignin, ASL) spektrofotometrijski pri valnoj duljini 205 nm, koristeći kvarcne kivete. Pritom su razrijeđenja filtrata pripravljena tako da očitana apsorbancija iznosi 0,7-1. Udjel lignina topljivog u kiselini izračunat je prema jednadžbi **[2]**:

$$w(\text{LTK}) = \frac{A \cdot D \cdot V}{\alpha \cdot b \cdot m} \quad \mathbf{[2]}$$

Gdje je:

A = apsorbancija uzorka izmjerena pri 205 nm;

D = faktor razrijeđenja;

V - volumen filtrata (0,112 L za dvostupanjsku hidrolizu, odnosno izmjereni volumen tekuće faze za obradu razrijeđenom kiselinom)

a - konstanta, 110 g L⁻¹cm⁻¹;

b - širina kivete (iznosi 1 cm);

m - masa uzorka uzetog u analizu (oko 0,4 g za dvostupanjsku hidrolizu, odnosno masa suhe tvari ulazne sirovine za obradu razrijeđenom kiselinom)

3.3.5.5. Određivanje furana spektrofotometrijski

U tekućoj fazi dobivenoj kiselinskom predobradom spektrofotometrijski je određena koncentracija furana, mjerenjem apsorbancija pri 284 i 320 nm (Martinez i sur.,2000). Prethodno je izrađen baždarni pravac mjerenjem apsorbancije otopina furana poznate koncentracije.

Uzorak koji sadrži nepoznatu koncentraciju furana razrijeđen je demineraliziranom vodom u omjeru 1:1000 te su izmjerene apsorbancije pri 284 i 320 nm i izračunata je njihova razlika. Koncentracija se odredi iz sljedeće jednadžbe baždarnog pravca **[3]**:

$$\gamma(\text{furani}) = \frac{\Delta A - 0,0158}{0,2496} \cdot R^2 \quad \mathbf{[3]}$$

Gdje je:

$\gamma(\text{furani})$ – masena koncentracija furana [g/L]

$\Delta A = A_{284} - A_{320}$

3.3.5.6. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC)

HPLC metodom analizirani su uzorci tekuće faze dobivene nakon kiselinske predobrade lignocelulozne sirovine i filtrati dobiveni dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom čvrstih uzoraka (uzorci sirovine i čvrste faze dobivene kiselinskom predobradom).

Uzorci su pripremljeni na način opisan u poglavlju 3.3.5.6.1., a za analizu je korišten kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10A VP (Shimadzu, Kyoto, Japan). U uzorcima

su određivane koncentracije monosaharida (glukoze, ksiloze, arabinoze) i inhibitora (mravlja, octena i levulinska kiselina). Za pripremu svih otopina korištena je redestilirana voda čija je vodljivost iznosila manje od 1 μ S. Kao pokretna faza korištena je otopina H₃PO₄ (0,1 % vol/vol) u vodi. Po 20 μ L svakog uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od 55 °C i brzini protoka pokretne faze od 0,5 mL min⁻¹. Podaci su analizirani pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10. Iz jednadžbi baždarnih pravca navedenih u Tablici 9) izračunate su koncentracija monosaharida i inhibitora u analiziranim uzorcima.

Tablica 9. Retencijska vremena i baždarni pravci

Spoj	T _R (min)	Jednadžba baždarnog pravca
Glukoza	13,012	A = 377242,1858 $\gamma_{glukoza}$ - 4487,06
Ksiloza	13,813	A = 362057,08 $\gamma_{ksiloza}$ + 5598,61
Arabinoza	14,952	A = 366483,61 $\gamma_{arabinoza}$ + 9888,80
Mravlja kiselina	18,465	A = 112024,49 $\gamma_{mravlja\ kiselina}$ + 4968,11
Octena kiselina	19,936	A = 164952,58 $\gamma_{octena\ kiselina}$ + 2260,95
Levulinska kiselina	21,508	A = 331566,10 $\gamma_{levulinska\ kiselina}$ - 865,38

3.3.5.6.1. Priprema uzoraka tekuće faze za analizu HPLC metodom

U uzorcima uzetim nakon kiselinske predobrade lignocelulozne sirovine i u kiselinskim hidrolizatima dobivenim dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom čvrstih uzoraka sirovine i čvrste faze dobivene predobradom provedeno je taloženje proteina dodatkom 10% otopine cinkovog sulfata heptahidrata (10% w/v) u omjeru 1:1 (vol/vol). Dodano je 700 μ L uzorka i 700 μ L otopine cinkovog sulfata heptahidrata. Uzorci su snažno izmješani tijekom 20-tak sekundi (mikser EV-100, Tehnica, Železniki, Slovenija) i ostavljeni da odstoje 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Istaloženi proteini i biomasa izdvojeni su centrifugiranjem (10000 g, 5 min; HC-240, Tehnica, Železniki, Slovenija), a supernatant je profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama veličine 0,22 μ m (LLG-Syringe filters SpherosNylon, 0.22 μ m/25 mm; LLG Labware). Pripremljeni uzorci su analizirani pomoću Shimadzu CLASS-VP LC-10A VP sustava (Poglavlje 3.2.2.)

3.3.6. Izračunavanje udjela strukturnih ugljikohidrata

Masa polisaharida (glukan, ksilan, arabinan) u lignoceluloznoj sirovini i u čvrstoj fazi nakon predobrade izračunata je iz mase odgovarajućih monosaharida (glukoze, ksiloze, arabinoze) u hidrolizatu nakon predobrade i filtratu nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize uz pomoć korekcijskog faktora (K_f) prema jednadžbi **[4]**.

$$m_p = c_{\text{monosaharida}} \cdot V_{\text{hidr}} \cdot K_f \quad \mathbf{[4]}$$

gdje je:

m_p – masa pojedinog polisaharida (g)

$c_{\text{monosaharida}}$ – koncentracija monosaharida (g/L)

V_{hidr} – volumen [L] lignoceluloznog hidrolizata (tekuće faze nakon predobrade) odnosno filtrata nakon dvostupanjske hidrolize

K_f - korekcijski faktor omjer molekulske mase monomerne građevne jedinice ugljikohidrata i monosaharida koji iznosi:

$K_f = 0,88$ za pentoze (ksiloza i arabinoza) (tj. $132 \text{ g mol}^{-1}/150 \text{ g mol}^{-1}$),

$K_f = 0,9$ za heksoze (glukoza, galaktoza i manoza) (tj. $162 \text{ g mol}^{-1}/180 \text{ g mol}^{-1}$)

Udjel strukturnih polisaharida u lignoceluloznoj sirovini i čvrstoj fazi nakon predobrade izračunava se prema jednadžbi **[5]**:

$$w_{\text{CHO}} = \frac{m_p}{m_{\text{uz}} \cdot w_{\text{s.tv.}}} \quad \mathbf{[5]}$$

gdje je:

w_{CHO} –maseni udjel polisaharida (g ugljikohidrata / g suhe tvari) [%]

m_p – masa polisaharida [g] u uzorku, tj. čipsu bukve ili predobrađenoj lignoceluloznoj sirovini (LCS);

$w_{\text{s.tv.}}$ -udjel suhe tvari u uzorku;

m_{uz} – masa čvrstog uzorka [g] podvrgnutog kiselinskoj hidrolizi (oko 0,4 g)

3.3.7. Izračunavanje iskorištenja glukana, ksilana s primjesama manana i galaktana

Nakon predobrade sirovine izračunato je iskorištenje glukana, ksilana i ukupnog lignina za različite uvjete predobrade prema jednadžbi **[6]** :

$$\eta = \frac{m_{P/FK}}{m_{P/SIR}} \cdot 100 = \frac{m_{FK} \cdot W_{s.tv./FK} \cdot W_{P/s.tv./FK}}{m_{SIR} \cdot W_{s.tv./SIR} \cdot W_{P/s.tv./SIR}} \cdot 100 \quad [\%] \quad [6]$$

gdje je:

η - iskorištenje

$m_{P/FK}$ – masa pojedinog polimera (glukan, odnosno manan) u krutoj fazi nakon obrade (g);

$m_{P/SIR}$ – masa istog polimera (glukan, odnosno manan) u sirovini (g);

m_{FK} – masa krute faze (vlažnog filtarskog kolača) nakon obrade sirovine (g);

$W_{s.tv./FK}$ – maseni udio suhe tvari u krutoj fazi tj. filtarskom kolaču nakon obrade sirovine (FK);

$W_{P/s.tv./FK}$ – maseni udio polimera (glukan, manan s primjesama ksilana i galaktana) u suhoj tvari krute faze predobrađene sirovine tj. filtarskog kolača;

m_{SIR} – masa lignocelulozne sirovine (g);

$W_{s.tv./SIR}$ – maseni udio suhe tvari u lignoceluloznoj sirovini

$W_{P/s.tv./SIR}$ – maseni udio polimera (glukan, manan s primjesama ksilana i galaktana) u suhoj tvari sirovine

Iskorištenje arabinana nije izračunato zbog njegovog malog udjela u korištenoj sirovini. Na sličan način izračunato je iskorištenje na ukupne polimere [7] i na ukupnu suhu tvar [8].

$$\eta = \frac{m_{P/FK}}{m_{UP/SIR}} \cdot 100 = \frac{m_{FK} \cdot W_{s.tv./FK} \cdot W_{P/s.tv./FK}}{m_{SIR} \cdot W_{s.tv./SIR} \cdot W_{UP/s.tv./SIR}} \cdot 100 \quad [\%] \quad [7]$$

gdje je:

$m_{UP/SIR}$ – masa ukupnih polimera u sirovini (g);

$W_{UP/s.tv./SIR}$ – maseni udio ukupnih polimera u suhoj tvari sirovine

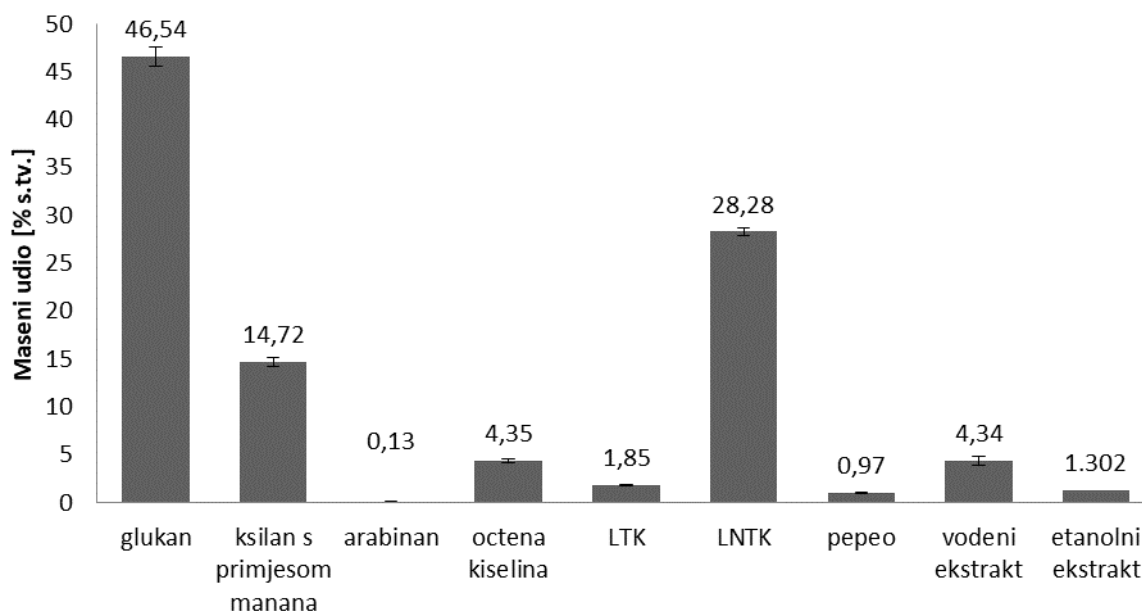
$$\eta = \frac{m_{P/FK}}{m_{s.tv.}} \cdot 100 = \frac{m_{FK} \cdot W_{s.tv./FK} \cdot W_{P/s.tv./FK}}{m_{SIR} \cdot W_{s.tv./SIR}} \cdot 100 \quad [\%] \quad [8]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Za istraživanje u ovom radu odabran je čips bukve s 93,52% suhe tvari kao potencijalna lignocelulozna sirovina. Debljina čipsa, izmjerena pomičnom mjerkom, iznosila je prosječno $0,59 \pm 0,189$ cm, uz raspon vrijednosti 0,3 - 1,1 cm. Materijal je sadržavao i manju količinu sitnih čestica. Određen je kemijski sastav sirovine te su provedena preliminarna istraživanja s ciljem optimiranja uvjeta predobrade razrijeđenom sumpornom kiselinom (0,5% w/v) u visokotlačnom reaktoru vlastite konstrukcije, uz različite temperature (160°C, 180°C i 200°C) i vremena zadržavanja (5 - 20 minuta) kako je vidljivo u planu eksperimenta (Tablica 8).

4.1 Kemijski sastav čipsa bukve

Sastav sirovine određen je radi usporedbe s literaturnim podacima, ali i kao polazište za usporedbu učinka različitih uvjeta kiselinske hidrolize. Sastav čipsa bukve, pa tako i bukve generalno, ovisi o različitim čimbenicima, a između ostalog i o geografskom položaju rasta drva. Shodno tome, udjeli celuloze, hemiceluloze i lignina, ali i udjeli monosaharida u ukupnim polisaharidima mogu varirati. Bitno je napomenuti da postoji razlika između građe hemiceluloze tvrdog i mekog drva. Glukan u tvrdom drvu, kao što je bukva, potječe isključivo iz glukoze koja nastaje razgradnjom celuloze, dok se kod mekog drva dio glukana nalazi i u hemicelulozi. Za tvrdo drvo masa hemiceluloze je zbroj masa ksilana, arabinana i acetilnih skupina koje izvan hemicelulozne strukture tvore octenu kiselinu (Hames, 2009).



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

Sastav suhe tvari čipsa bukve (Slika 14) određen je nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize uzorka te odvajanja čvrstog dijela (netopljivog lignina s pepelom) od tekuće faze u kojoj su tekućinskom kromatografijom analizirani topljivi lignin (Poglavlje 3.3.5.6., Materijali i metode) i pojedini monosaharidi. Iz koncentracija glukoze, ksiloze i arabinoze izračunate su njihove mase, koje su potom uz pomoć odgovarajućih korekcijskih faktora preračunate u mase i udjele glukana, ksilana i arabinana u sirovini (Poglavlje 3.3.6., Materijali i metode). Skoro polovinu suhe tvari čipsa bukve čini glukan (46,54 %). Budući da je iz literature poznato da glukan u tvrdom drvu potječe isključivo iz glukoze koja nastaje razgradnjom celuloze (Hames, 2009), možemo reći da je udio celuloze u suhoj tvari čipsa bukve oko 45 % što odgovara literaturi (Sun i Cheng, 2002) (Tablica 2).

Poznato je da hemiceluloza bukve sadrži više ksilana nego manana (Hames, 2009). Prema Da Silva Perez i sur. (2010) hidrolizom polisaharida bukve oslobađa se 71,91% glukoze, 24,11% ksiloze, 2,61% manoze, 0,82% galaktoze i 0,54% arabinoze. Važno je napomenuti da analitička kolona korištena u ovom radu ne omogućava razdvajanje ksiloze, galaktoze i manoze, već one imaju isto retencijsko vrijeme. Stoga se na tom retencijskom vremenu detektira ksiloza s primjesama manoze i galaktoze, a preračunavanjem na polisaharide u tom slučaju dobivamo ksilan s primjesom manana i galaktana (Slika 14).

Zbirni udio ksilana s primjesama manana i galaktana (14,72%, Slika 1) u suhoj tvari čipsa bukve otprilike je tri puta manji od udjela glukana (46,54%) dok je udio arabinana (0,13%) zanemariv u odnosu na udjele prethodno navedenih polisaharida. Potrebno je u nastavku istraživanja primjenom odgovarajuće kolone razdvojiti šećere u hidrolizatu kako bi se potom izračunao točniji sastav polisaharida bukve.

Tijekom dvostupanjske hidrolize uzorka sirovine, koja prethodi HPLC analizi, oslobodila se octena kiselina koja čini 4,35% od suhe tvari sirovine. Do njezinog oslobađanja došlo je hidrolizom acetil-ksilanskih jedinica iz hemiceluloze (Shahbazi i Zhang, 2010). Prema Hames (2009) možemo izračunati da je udio hemiceluloze u suhoj tvari čipsa bukve jednak zbroju udjela ksilana, arabinana i octene kiseline što iznosi 19,2% hemiceluloze, odnosno oko jedne petine od suhe tvari sirovine. Izračunati udio hemiceluloze je blizak donjim vrijednostima raspona hemiceluloze u bukovoj piljevini (Tablica 2) (Demirbaş, 2004, Demirbaş, 2003; Antonović, 2007; Bodírlău i sur. 2008; Kruse, 2011; Vassilev, 2012; Žegar, 2012; Marđetko, 2013), a odstupanja se mogu tumačiti kao uobičajene varijacije u sastavu lignoceluloznih materijala (Hanžek, 2015).

Ukupni lignin izračunat je kao zbroj topljivog i netopljivog lignina u suhoj tvari. Njegov udio u sirovini, koji iznosi oko 30% od suhe tvari, nešto je veći od vrijednosti navedenih u dostupnoj literaturi (Tablica 2). Rezultati provedene analize pokazuju da je

lignin topljiv u kiselini iznosio 6,14 % od ukupnog lignina. To je znatno manje nego u radu Lešić (2014) u kojem je udio lignina topljivog u kiselini u ukupnom ligninu iznosio 17,07%.

4.2. Kemijski sastav tekućih kiselinskih hidrolizata

U literaturi je opisana primjena sumporne kiseline za hidrolizu raznih lignoceluloznih sirovina, te predobrada ovom kiselinom rezultira degradacijom hemiceluloze i povećanom enzimskom razgradljivošću celuloze (Jönsson i Martin, 2015). Visokotlačni reaktor, primijenjen u našim eksperimentima, korišten je već ranije za predobradu lignoceluloznih sirovine kao što su pšenična slama (Mušak, 2016; Vidović, 2017; Grubišić, 2017; Marđetko i sur., 2018), kuruzovina (Lauder, 2016; Mušak, 2016) i kukuruzni oklasci (Mušak, 2016). Uvjeti predobrade čipsa bukve za eksperimente optimiranja kiselinske predobrade razrijeđenom sumpornom kiselinom odabrani su u skladu s navedenim radovima, a plan eksperimenata prikazan je u Tablici 8. Kemijski sastav tekuće faze odvojene nakon predobrade prikazan je u Tablici 10.

Preliminarni eksperimenti predobrade provedeni su pri sve tri temperature uz vrijeme zadržavanja 5 i 10 minuta. Na temelju sastava tekuće faze dobivene tijekom navedenih eksperimenata (Tablica 10), procijenjeno je da pri temperaturi 180°C treba istražiti utjecaj produljenog vremena zadržavanja (15 i 20 minuta). Ukupne koncentracije monosaharida u tekućoj fazi nakon predobrade čipsa bukve kretali su se u rasponu od 8,1 g/L do 13,53 g/L. Pritom je najveća koncentracija ukupnih monosaharida zabilježena pri uvjetima predobrade 180°C/10 minuta, a najmanja pri 160°C/5 minuta.

Iz rezultata je vidljivo da je koncentracija oslobođene ksiloze s primjesama manoze i galaktoze veća od koncentracije glukoze i arabinoze za sve provedene uvjete predobrade. Tijekom predtretmana razrijeđenom kiselinom hemiceluloza hidrolizira lakše od celuloze. Ksilan depolimerizira i formira topljive monomere i oligomere ksiloze (Chen i sur., 2012). Prema tome, razgradnja hemicelulozne frakcije i veća koncentracija ksiloze naspram glukoze i arabinoze u skladu je s literaturnim navodom. Najveća koncentracija ksiloze zabilježena je pri temperaturi predobrade od 180°C i vremenu zadržavanja od 10 minuta, a iznosila je 10,88 g/L, odnosno u istim uvjetima u kojima je bila prisutna i najveća koncentracija ukupnih monosaharida.

Tablica 10. Sastav tekuće faze dobivene predobradom čipsa bukve razrijeđenom sumpornom kiselinom (0,5 %w/v) u visokotlačnom reaktoru. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

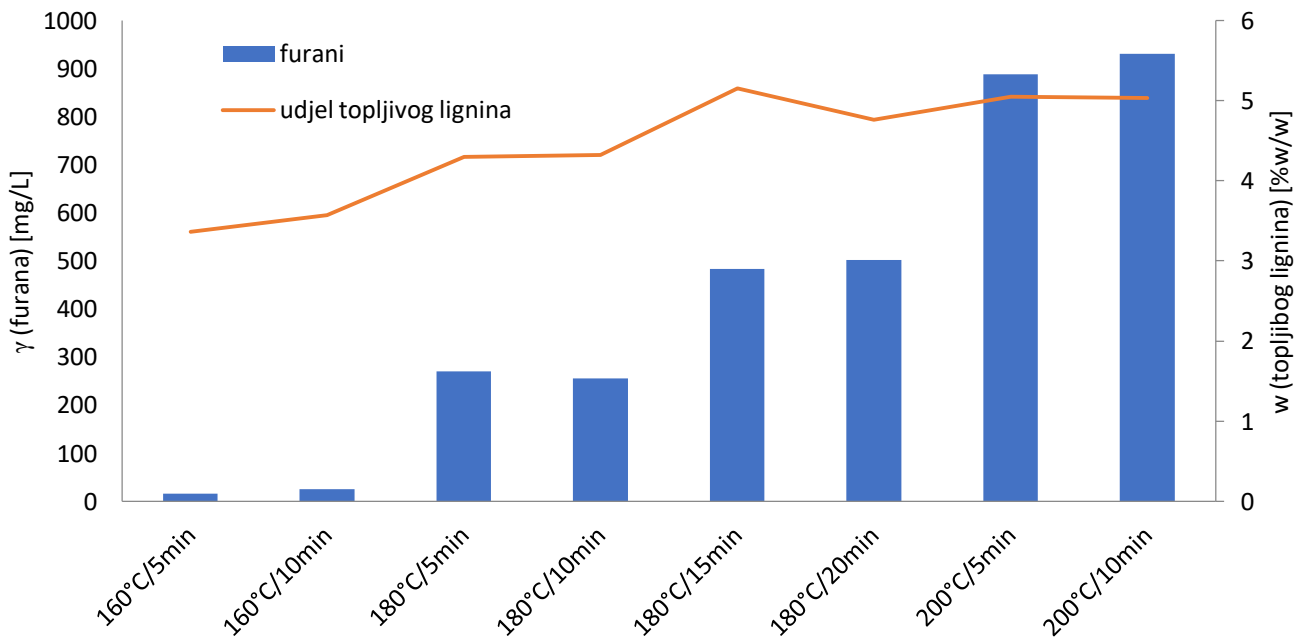
Temperatura redobrade [°C]	160		180				200	
Vrijeme predobrade [min]	5	10	5	10	15	20	5	10
γ(glukoze) [g/L]	1,26±0,082	1,49 ± 0,076	2,00 + 0,093	2,16 ± 0,087	2,34 ± 0,089	2,43 ± 0,094	3,78 ± 0,090	4,05 ± 0,108
γ(ksilozes primjesama manoze i galaktoze) [g/L]	6,33±0,005	7,55 ± 0,305	10,06 ± 0,027	10,88 ± 0,033	10,51 ± 0,180	10,33 ± 0,001	6,82 ± 0,024	6,44±0,016
γ(arabinoze) [g/L]	0,51±0,001	0,53 ± 0,007	0,57 ± 0,002	0,49 ± 0,001	0,72 ± 0,004	0,68 ± 0,043	0,56 ± 0,007	0,52±0,002
γ(mravljje kiseline) [g/L]	0,07±0,035	0,18 ± 0,016	0,11 ± 0,002	0,14 ± 0,002	0,57 ± 0,059	0,61 ± 0,062	0,63 ± 0,017	0,65±0,001
γ(octene kiseline) [g/L]	1,29±0,096	1,67 ± 0,029	2,21 ± 0,033	2,51 ± 0,006	3,46 ± 0,048	3,37 ± 0,355	3,18 ± 0,048	3,30±0,108
γ(levulinske kiseline) [g/L]	0	0	0	0	0,17 ± 0,040	0,16 ± 0,098	0,23 ± 0,004	0,26±0,001

Pri temperaturi od 160°C došlo je do nepotpune hidrolize hemiceluloze zbog čega je manja koncentracija ksiloze, manoze i galaktoze prešla u hidrolizat. Pri istoj temperaturi je produženjem vremena predtretmana s 5 na 10 minuta došlo je do porasta koncentracije oslobođene ksiloze. Isti trend povećanja koncentracije ksiloze s primjesama manoze i galaktoze uočen je pri 180 °C uz kraće trajanje predobrade (5 i 10 minuta). Produženjem obrade pri 180 °C na 15 i 20 minuta došlo je do istovremenog pada koncentracije ksiloze, manoze i galaktoze te porasta koncentracije inhibitora. Pri 200°C je bila još uočljivija ovisnost pada koncentracije ksiloze, manoze i galaktoze o temperaturi i trajanju obrade (Tablica 10), a u tim ekstremnijim uvjetima je također bila izraženija i razgradnja pentozna i heksoza u furfural, odnosno hidroksimetilfurfural (Tablica 10, Slika 15). Potom iz ova dva spoja dalje nastaje mravlja kiselina, a razgradnja hidroksimetilfurfurala daje levulinsku kiselinu (Jönsson i Martin, 2016).

Rast koncentracije furana, mravlje i levulinske kiseline zabilježen je pri temperaturi od 180°C uz duža vremena zadržavanja (15 i 20 minuta) te pri temperaturi od 200°C (Tablica 10).

Za razliku od koncentracije ksiloze, koja se smanjuje pri većim temperaturama i vremenima zadržavanja, koncentracija glukoze raste proporcionalno s povišenjem temperature i vremena zadržavanja (Tablica 10). Najmanja koncentracija glukoze od 1,26 g/L, zabilježena u najblažim uvjetima hidrolize (160°C/5 minuta), bila je tri puta manja od najveće koncentracije glukoze (4,05 g/L) zabilježene pri najekstremnijim uvjetima primjenjenim u opisanim istraživanjima (200°C/10 minuta). Veće temperature tijekom kiselinske hidrolize pogoduju izraženijoj hidrolizi celuloze pri čemu se oslobađa glukoza (Sun i Cheng, 2001).

Uz glukozu i ksilozu u hidrolizatima dobivenim predobradom čipsa bukve bila je prisutna i arabinoza, čije su koncentracije bile znatno niže od koncentracija ostalih monosaharida te su se kretale u rasponu od 0,49 do 0,72 g/L. To je svega 3,62 do 6,30% od ukupne koncentracije prisutnih šećera pa je zbog ovako malih udjela arabinoza zanemarena pri razmatranju optimalnih uvjeta predobrade. Promjena temperature i vremena zadržavanja nije se mogla povezati sa zabilježenim koncentracijama arabinoze nakon predobrade.



Slika 15. Koncentracije furana i udjeli lignina topljivog u kiselinu, određeni u tekućoj fazi dobivenoj predobradom čipsa bukve razrijeđenom sumpornom kiselinom (0,5 %w/v) u visokotlačnom reaktoru.

Iz Tablice 10 i Slike 15 vidljivo je kako pri 180°C uz vrijeme zadržavanja od 15 minuta koncentracija ksiloze pada, a furana raste. Taj zamijećeni trend u promjeni koncentracije ksiloze i furana kao inhibitora u skladu je s literaturom u kojoj se navodi da je veća temperatura izravno povezana s povećanom koncentracijom inhibitora (Chandel i sur., 2012). Uz furfural koji nastaje iz pentozna, degradacijom heksoza nastaje hidroksimetilfurfural (HMF), koji daljnjim izlaganjem povećanim temperaturama prelaze u mravlju i levulinsku kiselinu (Satimanont i sur., 2012).

Na Slici 15 vidljiv je trend povećanja koncentracije furana proporcionalno temperaturi i vremenu zadržavanja tijekom predobrade sirovine. Koncentracije furana u dobivenim tekućim hidrolizatima iznosile su od 16,03 do 931,09 mg/L. Navedene koncentracije značajno su manje od koncentracija furfurala i hidroksimetilfurfurala koje van der Pol (2014) navodi kao inhibirajuće za radne mikroorganizme, međutim pritom treba uzeti u obzir da inhibitori imaju sinergistički učinak i da se ne mogu razmatrati samo njihove pojedinačne koncentracije (van der Pol, 2014). Smjesa različitih inhibitora može dovesti do jačeg inhibicijskog djelovanja na mikroorganizme nego što je to u slučaju s pojedinačnim inhibitorima (Alriksson, 2006).

Tablica 10 prikazuje kako s porastom temperature dolazi do porasta koncentracije mravlje, octene i levulinske kiseline. Produženo vrijeme zadržavanja, visoke temperature

predobrade i kiseli medij, dovode do daljnje degradacije furfurala i hidroksimetilfurfurala u mravlju i levulinsku kiselinu. Zna se da najveće inhibicijsko djelovanje ima mravlja kiselina, a slijede je levulinska te octena kiselina (Mussatto i Roberto, 2003).

Mravlja kiselina nastaje razgradnjom furana (furfurala i hidroksimetilfurana) (Jönsson i Martin, 2016). Bila je prisutna u svim analiziranim uzorcima tekućih hidrolizata i njezine su koncentracije proporcionalne temperaturi i vremenu predobrade, a iznosile su od 0,07 g/L do 0,65 g/L.

U blažim uvjetima obrade (160°C/5 i 10 minuta, 180°C/5 i 10 minuta) levulinska kiselina nije bila detektirana. Bila je prisutna tek nakon obrade pri 180°C/15 minuta, a potom je njena koncentracija rasla proporcionalno temperaturi i vremenu (Tablica 10). Koncentracije levulinske kiseline kretale su se od 0,16 g/L do 0,26 g/L u analiziranim uzorcima. Ovi rezultati su u skladu s literaturnim izvorima u kojima je navedeno da levulinska kiselina nastaje u ekstremnim uvjetima visoke temperature ili dugog vremena zadržavanja razgradnjom hidroksimetilfurfurala (Jönsson i Martin, 2015). Pojava levulinske kiseline u korelaciji je s povećanjem koncentracije furana (otprilike 500 mg/L) pri 180°C i temperaturama zadržavanja od 15 i 20 minuta.

Razgradnjom hemiceluloze oslobađaju se octena kiselina i monosaharidi od kojih je u bukvi najzastupljenija ksiloza (Hames, 2009; Da Silva Perez i sur., 2010). Iz Tablice 10. možemo vidjeti da se povećanja koncentracija tih dvaju spojeva međusobno podudaraju u svim analiziranim uzorcima. Pritom su se koncentracije octene kiseline kretale od 1,29 g/L do 3,46 g/L.

Udio topljivog lignina u dobivenim kiselinskim hidrolizatima pokazuje trend blagog porasta s povećanjem temperature i vremena zadržavanja (Slika 15), uz neka odstupanja koja tumačimo kao posljedicu nereproducibilnih uvjeta u korištenom visokotlačnom reaktoru.

U Tablici 11 prikazana su iskorištenja glukana i ksilana razgrađenih tijekom predobrade. Izražena su kao udjeli razgrađenog glukana odnosno ksilana u glukanu odnosno ksilanu prisutnom u sirovini na početku procesa. Ove vrijednosti također su izračunate na ukupne polisaharide i na suhu tvar početne sirovine.

Tablica 11. Udio početnih polisaharida koji su predobradom razgrađeni u monosaharide i prešli u tekuću fazu

Temperatura predobrade [°C]	160		180				200	
	5	10	5	10	15	20	5	10
Vrijeme predobrade [min]	5	10	5	10	15	20	5	10
Iskorištenje glukana [%]	3,44	4,08	4,87	5,37	5,95	6,01	8,55	9,15
Iskorištenje ksilana [%]	53,42	65,48	75,71	83,64	82,74	78,87	47,63	45,72
Iskorištenje glukana na ukupne polisaharide [%]	15,85	15,56	16,13	16,27	17,56	18,43	34,40	36,92
Iskorištenje ksilana na ukupne polisaharide [%]	77,83	79,00	79,35	80,11	77,16	76,54	60,62	58,33
Iskorištenje glukana na suhu tvar [%]	1,60	1,90	2,27	2,50	2,77	2,80	3,98	4,26
Iskorištenje ksilana na suhu tvar [%]	7,86	9,64	11,15	12,31	12,18	11,61	7,01	6,73

Navedeni udjeli su za ksilan najveći pri temperaturi 180°C uz vrijeme zadržavanja 10 minuta (83,64% izračunato na početni udio ksilana, 80,11% izračunato na masu početnih polisaharida odnosno 12,31% izračunato na masu suhe tvari čipsa bukve. Pri tim uvjetima je postignuto iskorištenje glukana oko 5% na početni glukan u sirovini, dok je najveće iskorištenje glukana oko 6 % pri uvjetima 180°C/20 minuta. S obzirom na to da u tvrdom drvu glukoza potječe uglavnom iz celuloze, vidljivo je da je celuloza također djelomično razgrađena i da stupanj njezine razgradnje, odnosno iskorištenje glukana, povećava pri većim temperaturama i dužim vremenima zadržavanja. Celuloza iz čvrstog ostatka se može koristiti za enzimski tretman celulazama, stoga je pri provođenju kiselinske hidrolize važno izbjeći njezinu prekomjernu razgradnju.

4.3. Kemijski sastav čvrste faze dobivene kiselinskom predobradom

Hidrolizom čvrstog dijela zaostalog nakon kiselinske predobrade u analiziranim uzorcima detektirani su monosaharidi (glukoza te ksiloza s primjesama manoze i galaktoze) i octena kiselina. Udjeli glukoze i ksiloze u hidrolizatu čvrste faze preračunati su na udjele glukana i ksilana u čvrstoj fazi (Tablica 12).

Tablica 12. Sastav čvrste faze dobivene predobradom čipsa bukve razrijeđenom sumpornom kiselinom (0.5 w/v) u visokotlačnom reaktoru

Temperatura i vrijeme predobrade	w(glukana) [w/w s.tv.]	w(ksilana) [w/w s.tv.]	w(octene kiseline) [w/w s.tv.]	w(LTK) [w/w s.tv.]	w(LNTK +pepeo) [w/w s.tv.]
160°C/5min	47,37	4,81	23,8	1,66	27,28
160°C/10min	37,2	3,81	23,21	1,58	28,47
180°C/5min	57,35	2,45	5,37	1,51	29,16
180°C/10min	56,12	2,8	10,23	1,51	32,07
180°C/15min	51,65	3,43	10,55	1,24	29,19
180°C/20min	61,6	0	6,4	1,4	27,95
200°C/5min	62,79	0	5,8	1,87	31,91
200°C/10min	50,72	0	7,86	1,46	34,94

Glukoza je detektirana pri svim uvjetima predobrade, a udjeli su iznosili između 37,2 i 62,79%. Pri intenzivnijim uvjetima predobrade pada udio ksilana s primjesama manana i galaktana, a pri uvjetima 180°C/20 minuta i pri ekstremnijim uvjetima obrade njihova se prisutnost više nije mogla detektirati.

Udjeli octene kiseline kretali su se u rasponu od 5,37 do 23,21%. Ovako širok raspon može se pripisati nehomogenosti sirovine unatoč miješanju prije upotrebe.

Za primijenjene temperature i vremena zadržavanja, maseni udio lignina u čvrstim fazama (Tablica 12 bio) je veći od masenog udjela lignina u sirovini (Slika 14). Pravilan trend promjene udjela lignina nije uočen zbog njegove složene strukture te zbog mogućeg nastajanja pseudolignina. Pseudolignin je polifenolni materijal koji nastaje iz fragmenata celuloze ili hemiceluloze oslobođenih tijekom kiselinske hidrolize pri ekstremnijim uvjetima predobrade (Xianzhi i Ragauskas, 2017).

5. ZAKLJUČCI

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

1. Suha tvar čipsa bukve, korištenog u ovim eksperimentima, sadrži 46,54% (w/w) glukana, 14,72% ksilana s primjesama manana i galaktana, 0,13% arabinana, 4,35% octene kiseline, 28,28% lignina netopljivog u kiselini, te 1,85% lignina topljivog u kiselini te 0,97% pepela. Ekstraktivni spojevi tvorili su 5,64% suhe tvari.
2. Provedena su preliminarna istraživanja s ciljem optimizacije uvjeta kiselinske hidrolize čipsa bukve razrijeđenom sumpornom kiselinom (0,5 % w/v) u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama (160°C, 180°C i 200°C) i vremenima zadržavanja (5 - 20 minuta). Na temelju koncentracija oslobođenih monosaharida i prisutnih inhibitora procijenjeno je da su za čips bukve optimalni uvjeti za provođenje ovog procesa temperatura 180°C uz vrijeme zadržavanja 10 minuta. U tim uvjetima dobiven je hidrolizat sljedećeg sastava: 10,88 g/L ksiloze s primjesama manana i galaktana, 2,16 g/L glukoze, 0,49 g/L arabinoze, 0,14 g/L mravlje kiseline, 2,51 g/L octene kiseline, 255,61 mg/L furana i 4,32 % lignina topljivog u kiselini. Pri navedenim uvjetima predobrade levulinska kiselina nije detektirana.
3. Zbog najjače razgradnje celuloze pri temperaturi od 200°C i vremenu zadržavanja od 10 minuta zabilježena je najveća koncentracije glukoze u tekućoj fazi iznosila je 4,05 g/L. Koncentracija arabinoze je u svim hidrolizatima bila znatno manja od koncentracija drugih monosaharida.
4. U suhoj tvari čvrste faze, zaostale nakon procesa, bilo je najviše glukana (37,2 – 62,79% w/w), dok je udio ksilana s primjesom manana i galaktana iznosio svega 2,45 – 4,81 % w/w. Ostatak uzorka činio je većinom netopljivi lignin (27,28 – 34,94 % w/w). Čvrste faze sadržavale su i octenu kiselinu (5,37 do 23,21% w/w).
5. Koncentracije mravlje, octene, levulinske kiseline, furana i lignina topljivog u kiselini rastu s povećanjem intenziteta predobrade (povećanjem temperature i dužim vremenom zadržavanja).
6. Zbog nemogućnosti razdvajanja ksiloze, galaktoze i manoze na korištenoj analitičkoj koloni bilo je moguće detektirati ksilozu s primjesama manoze i galaktoze. Stoga je u nastavku istraživanja potrebno primijeniti odgovarajuću analitičku kolonu radi točnijeg određivanja sastava polisaharida u čipsu bukve te tekućoj i čvrstoj fazi dobivenoj predobradom sirovine.

6. LITERATURA

1. Alriksson B. (2006) Ethanol from lignocellulose : Alkali detoxification of dilute-acid spruce hydrolysates (Licentiate dissertation). Faculty of Technology and ScienceBiochemistry, Karlstad University, Karlstad, Sweden.
2. Anonymus (2015) Perforum – Razvoj održivih zajednica <<http://www.perforum.info/index.php?topic=120.0>> Pristupljeno 27. lipnja 2019.
3. Antonović A., Jambreković V., Pervan S., Ištvančić J., Moro M., Zule J. (2007) Utjecaj lokaliteta uzorkovanja na grupni kemijski sastav bijeli bukovine (*Fagus sylvatica* L). *Drvna industrija* **58**(3): 1949-2019.
4. Bajpai P. (2016) Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels production, 1. izd., Springer. str. 7-12.
5. Bamdad H., Hawboldt K., MacQuarrie S. (2017). A review on common adsorbents for acid gases removal: Focus on biochar. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **81**: 2000-2019.
6. Banić S., Janev Hutinec B. (2006) Drveće Maksimira : priručnik za određivanje vrsta, 1. izd., Javna ustanova "Maksimira".
7. Bari E., Taghiyari H.R., Mohebbi B., Clausen C.A., Schmidt O., Ghanbary M.A.T., Vaseghi M.J. (2015) Mechanical properties and chemical composition of beech wood exposed for 30 and 120 days to white-rot fungi. *Holzforschung* **69**(5): 1947-2019.
8. Barewalls (2019) Barewalls posters and prints. <<https://www.barewalls.com/posters-art-prints/wood-material-beech-trunk.html>> Pristupljeno 27.lipnja 2019.
9. Batzias D.F., Sidiaras D.K. (2009) Hydrolyzed biomass for dye adsorption in fixed bed systems. Proc. 8th World Congress of Chemical Engineering (WCCE8), Montreal, Canada.
10. Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S. (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56** (3–4): 1975-2019.
11. Bodirlau R., Teaca C. A., Spiridon, I. (2008) Chemical modification of beech wood: Effect on thermal stability. *BioResources* **3**(3): 1964-2019.
12. Brodeur G., Yau E., Badal K., Collier J., Ramachandran K.B., Ramakrishnan S. (2011) Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. *Enzyme Research* **2011**: 2010-2019.

13. Carrere H., Rouches E., Steyer J. P., Zhou S. (2015) White-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass of anaerobic digestion: Impact of glucose supplementation. *Process Biochemistry* **11**: 2000-2019.
14. Chandel A. K., Felipe A.F., Vaz de Arruda P.A., Milessi T.S.S., da Silvia S.S., Gracias M. (2012) Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: State of the art. U: D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization, 1.izd., da Silva, S.S., Chandel, A.K., ur., Springer. str. 39-61.
15. Chen X., Shekiri J., Franden M. A. (2012) The impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process. *Biotechnology for Biofuels* **5**: 2008-2019.
16. Cohen R., Persky L., Hadar Y. (2002) Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**(5): 1975-2019.
17. Colom X., Carrillo F., Nogues F., Garriga P. (2003) Structural analysis of photodegraded wood by means of FTIR spectroscopy. *Polymer degradation and Stability* **80**: 2000-2019.
18. Čavlović J., Anić I. (2008.) Gospodarenje običnom bukvom u Hrvatskoj. *Gozdarski študijski dnevni* **26**: 1967-2019.
19. Da Silva Perez D., Guillemain A., Berthelot A., n'Guyen-The N., de Morogues F., Gomes C. (2009) Evaluation of forestry biomass quality for the production of second-generation biofuels. *Cellulose Chemistry and Technology* **44**: 2009-2019.
20. Demirbaş A. (2003) Relationships between lignin contents and fixed carbon contents of biomass samples. *Energy Conversion and Management* **44**: 1979-2019.
21. Demirbaş A. (2004) Combustion characteristics of different biomass fuels. *Progress in Energy and Combustion Science* **30**: 1975-2019.
22. Demirbaş A. (2005) Biomass Feedstocks. *Biotechnology* **7**: 1975-2019.
23. Demirbaş A. (2009) Biomass Feedstocks. U: Biofuels, 1.izd., Springer. str 45-85.
24. Fan L. T., Gharpuray M. M., Lee Y. H. (2011) Cellulose Hydrolysis. U: Biotechnology Monographs, 3. izd., Springer. str. 1-17.
25. Galbe M., Zacchi G. (2007) Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. U: *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* **108**: Springer. str 41-65.
26. Grubišić M. (2017) Proizvodnja bioetanol na blago kiselinskim hidrolizatima pšenične slame dobivenim pomoću sumporne kiseline u različitim mjerilima, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

27. Hames B. R. (2009) Biomass compositional analysis for energy applications. U: *Biofuels, Methods In Molecular Biology*. Mielenz J.R., ur., 1. izd, Humana Press. str. 145-167.
28. Hanžek M. (2015) Utjecaj alkalne obrade kukuruznih oklasaka na udjele lignina i celuloze, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
29. Harmsen P., Lips S., Bakker R. (2013) Pretreatment of lignocellulose for biotechnological production of lactic acid. Wageningen UR Food & Biobased Research. 1384.
30. Hu R., Lin L., Liu T., Liu S. (2010) Dilute sulfuric acid hydrolysis of sugar maple wood extract at atmospheric pressure. *Bioresource Technology* **101**: 1991-2019.
31. Ioelovich M. (2014) Correlation analysis of enzymatic digestibility of plant biomass. *Biomass Conversion and Biorefinery* **4**(3): 2011-2019.
32. Isikgor H. F., Becer C. R. (2015) Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry* **6**: 2010-2019.
33. Ištvančić J., Antonović A., Pervan S., Jambrečković V., Benković Z., Kavran M. (2008) Pılanarstvo u Republici Hrvatskoj, II. dio – Hrvatsko pilanarstvo. *Drvna industrija* **59**(4): 1949-2019.
34. Jönsson L. J., Martin C. (2016) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory byproducts and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Tehnology* **199**: 1991-2019.
35. Korunek T. (2015) Optimiranje vremena ekstrakcije i određivanje celuloze u kukuruznim oklascima, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
36. Kruse A., Dinjus E., Tröger N. (2011) Hydrothermal carbonization –1. influence of lignin in lignocelluloses, *Chemical Engineering & Technology* **34**(12): 1980-2019.
37. Kumar P., Barrett D. M., Delwiche M. J., Stroeve P. (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **48**: 1987-2019.
38. Lange J. P. (2007) Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. **1**: 2000-2019.
39. Lauder A. (2016) Predobrada kukuruzovine za proizvodnju bioetanola, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
40. Lee D., Owens V. N., Boe A., Jeranyma P. (2007) Composition of herbaceous biomass feedstocks, 1.izd., North Central Sun Grant Center. str. 5-15.

41. Lenihan P., Orozco A., O'Neill E., Ahmad M. N. M., Rooney D. W., Walker G., M. (2009) Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal* **156**: 2001-2019.
42. Lešić T. (2014) Analiza ekstraktivnih tvari i lignina u bukovoj piljevini, pšeničnoj slami i kukuruznim oklascima, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
43. Marđetko N. (2013) Uzgoj micelija gljive *Pleurotus ostreatus* na bukovoj piljevini, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
44. Marđetko N., Novak M., Trontel A., Grubišić M., Galić M., Šantek B. (2018) Bioethanol production from dilute-acid pre-treated wheat straw liquor hydrolysate by genetically engineered *saccharomyces cerevisiae*, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **32** (4): 2000-2019.
45. Marić V. (2000) Biotehnologija i sirovine, 1.izd., Stručna i poslovna knjiga. str. 93-95.
46. Mussatto S. I., Ballesteros L. F., Martins S., Teixeira J. A. (2009) Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. U: *Biotechnology for agro-industrial residues*, Singh nee' Nigam P. Pandey A., ur., 1. izd., Intechopen. str. 121-140.
47. Mussatto, S.I., Roberto, I.C. (2003). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. *Bioresource Technology* **93**: 1991-2019.
48. Mušak L. (2016) Određivanje sastava lignoceluloznih hidrolizata pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
49. Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000a). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* **74**: 1991-2019.
50. Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000b) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* **74**: 1991-2019.
51. Palonen H. (2004) Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose, Dissertation for the degree of doctor of technology VTT Technical Research Centre of Finland.
52. Pandey K.K., Pitman A.J. (2003) FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* **52**: 2000-2019.
53. Pandey A., Larroche C., Ricke S. C., Dussap C-G., Gnansounou E. (2011) Biofuels Alternative Feedstocks and Conversion Processes, 1.izd, Elsevier. str 9-22.

54. Petravić-Tominac V., Tolvajčić M., Stanzer D., Mrvčić J., Šantek B. (2017) Kvasci za proizvodnju bioetanola iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina. *Glasnik zaštite bilja* **5**: 1956-2019.
55. Quintero-Ramirez R. (2014) Hydrolysis of lignocellulosic biomass. U: Sugarcane bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability, Luis Augusto Barbosa Cortez, ur., 1.izd., Blucher. str. 717-732.
56. Rass-Hansen J., Falsig H., Jorgensen B., Christensen C. H. (2007) Perspective Bioethanol: fuel or feedstock. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **82**: 1983-2019.
57. Ratnaweera D. R., Saha D., Pingali S. V., Labbe N., Naskar A. K., Dadmun M. (2015) The impact of lignin source on its self-assembly in solution. *RSC Advances*. **5**: 2011-2019.
58. Reece J. B., Urry L. A., Cain L. M., Wasserman S. A., Minorsky P. V., Jackson R. B.(2011) The structure and function of large biological molecules. Pearson Education, Inc.London.
59. Salvachua D., Prieto A., Lopez-Abelairas M., Lu-Chau T., Martinez A.T., Martinez M.J. (2011) Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technology* **102**: 1991-2019.
60. Satimanont S., Luengnaruemitchai A., Wongkasemjit S. (2012) Effect of temperature and time on dilute acid pretreatment of corn cobs. *Int. J. Chem. Biol. Sci.* **6**: 2011-2019.
61. Shahbazi A., Zhang B. (2010). Dilute and concentrated acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. U: Bioalcohol Production, 1.izd., Woodhead Publishing. str 143–158.
62. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 1953-2019.
63. Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Crocker D. (2012) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure (LAP). NREL Technical Report.
64. Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review, *Bioresource Technology* **83**: 1991-2019.
65. Taherzadeh M.J., Karimi K. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **9**: 2000-2019.

66. Tayyab M., Noman A., Islam W., Waheed S., Arafat Y., Ali F., Zaynab M., Lin S., Zhang H., Lin W. (2017) Bioethanol production from lignocellulosic biomass by environment-friendly pretreatment methods: a review. *Applied Ecology and Environmental Research* **16**(1): 2010-2019.
67. van der Pol E., Bakker R., Baets P., Eggink G. (2014) By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels. *Applied microbiology and Biotechnology* **93**: 2010-2019.
68. Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerjan W. (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology* **153**: 1926-2019.
69. Vassilev S. V., Baxter D., Andersen L. K., Vassileva C.G., Morgan T. J. (2012) An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass - Review article. *Fuel* **94**: 1922-2019.
70. Vidović P. (2017) Proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatu pšenične slame dobivenom alkalnom predobradom u visokotlačnom reaktoru, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
71. Xianzhi M, Ragauskas A. (2017) Pseudo-lignin formation during dilute acid pretreatment for cellulosic ethanol. *Recent Advances in Petrochemical Science* **1**(1): 2017-2019.
72. Zakzeski J., Bruijninx P., Jongerijs A., Weckhuysen B. (2010) The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical Reviews* **110**: 1924-2019.
73. Zhang L., Liu Y., Niu X., Liu Y., Liao W. (2012) Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 and corresponding enzymatic hydrolysis. *Biomass & Bioenergy* **37**: 1991-2019.

7. PRILOZI

Prilog 1. Volumeni tekuće faze te masa i udio suhe tvari u vlažnom čvrstom ostatku dobivenom predobradom čipsa bukve

Temperatura predobrade [°C]	160		180				200	
Vrijeme predobrade [min]	5	10	5	10	15	20	5	10
Volumen tekuće faze [L]	7,85	7,86	7	7,15	7,32	7,1	6,5	6,62
Masa vlažnog čvrstog ostatka [g]	1388	1359,4	1329,7	1302,8	1205,72	1236,27	1260	1318,2
w(suhe tvari vlažnog čvrstog ostatka) [% w/w]	22,19	23,69	17,79	21,03	21,64	17,95	25,55	20,16
m (suhe tvari u ukupnom mokrom kolaču) [g]	308,02	322,02	236,59	273,99	260,94	221,95	321	265,7

Izjava o izvornosti

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

Marko Bilić

ime i prezime studenta