

Enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka i proizvodnja etanola pomoću plijesni *Mucor indicus*

Fičko, Valentina

Master's thesis / Diplomski 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:159:846655>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019. godine

Valentina Fičko

1150/BPI

**ENZIMSKA HIDROLIZA
PREDOBRAĐENIH KUKURUZNIH
OKLASAKA I PROIZVODNJA
ETANOLA POMOĆU PLIJESNI
*Mucor indicus***

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Maria Novaka, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Nenada Marđetka, mag. ing. bioproc.

Diplomski rad je izrađen u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB-SLS; šifra projekta 9717).

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Mariu Novaku na razumijevanju i pomoći tijekom izrade ovog rada. Veliko hvala i Nenadu Marđetku, mag. ing. bioproc. bez čije pomoći i vodstva ovo ne bi bilo moguće. Također se zahvaljujem svim drugim djelatnicima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada koji su mi pomogli u odradi eksperimenata. I posljednju, ali ne i manje važnu, zahvalu iskazujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci, razumijevanju i potpori tijekom cijelog obrazovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

ENZIMSKA HIDROLIZA PREDOBRAĐENIH KUKURUZNIH OKLASAKA I PROIZVODNJA ETANOLA POMOĆU PLIJESNI *Mucor indicus*

Valentina Fičko, 1150/BPI

Sažetak: Lignocelulozne sirovine poput kukuruznih oklasaka najčešće ostaju neiskorištene, a jeftina su sirovina za proizvodnju biokemikalija kao što je bioetanol. Glavni problem upotrebe takvih sirovina u različitim procesima je potreba provođenja postupaka predobrade i hidrolize koji u konačnici poskupljuju ukupni proces proizvodnje. U ovom radu provedena je enzimska hidroliza (pri 50 °C; pH 4,8) kiselinski predobrađenih kukuruznih oklasaka (s 10-40 g L⁻¹ sirovine) pomoću enzima Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend (1-20 % vol vol⁻¹). Stupanj hidrolize od 85 % postignut je kombinacijom 2 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 5 % Cellulase, enzyme blend. Nakon optimizacije enzimske hidrolize, dobiveni hidrolizat korišten je za uzgoj plijesni *Mucor indicus* te proizvodnju etanola u HRCB-u i barbotirajućem bioreaktoru. Uspješnija proizvodnja bioetanola postignuta je u barbotirajućem bioreaktoru uz ostvarene pokazatelje uspješnosti procesa: $Y_{P/S} = 0,46 \text{ g g}^{-1}$; $Pr = 0,40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $E = 90,20 \%$.

Ključne riječi: enzimska hidroliza, lignocelulozne sirovine, *Mucor indicus*, bioetanol, HRCB, barbotirajući bioreaktor

Rad sadrži: 61 stranica, 17 slika, 8 tablica, 32 literaturnih navoda, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc .dr. sc. Mario Novak

Pomoć pri izradi: Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. Antonija Trontel
2. Doc. dr. sc. Mario Novak
3. Doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
4. Prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjena)

Datum obrane: 26. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF PRETREATED CORN COBS AND ETHANOL PRODUCTION BY *Mucor indicus*

Valentina Fičko, 1150/BPI

Abstract: Lignocellulosic raw materials like corn cobs are mostly left unused, but they are a cheap raw material for the production of biochemicals, e.g. bioethanol. The main problem with the utilization of such raw materials in different bioprocesses lies in the necessary pretreatments and hydrolysis that ultimately increase the cost of the overall production process. In this work, enzymatic hydrolysis (at 50 °C; pH 4.8) of dilute acid pretreated corn cobs (with 10-40 g L⁻¹) was performed using Viscozyme L and Cellulase, enzyme blend (1-20 % vol vol⁻¹). A hydrolysis rate of 85 % was obtained with the combination of 2 % vol vol⁻¹ Viscozyme L and 5 % vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend. After the optimization of enzymatic hydrolysis, the resulting hydrolysate was used for the cultivation of *Mucor indicus* and the production of ethanol in HRCB and bubbling bioreactor. Comparing the two production processes, bioethanol production in the bubbling bioreactor was more successful, with the following obtained bioprocess efficiency parameters: $Y_{P/S} = 0.46 \text{ g g}^{-1}$; $Pr = 0.40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $E = 90.20 \%$.

Keywords: enzymatic hydrolysis, lignocellulosic raw materials, *Mucor indicus*, bioethanol, HRCB, bubbling bioreactor

Thesis contains: 61 pages, 17 figures, 8 tables, 32 references, 2 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD Mario Novak, Assistant professor*

Technical support and assistance: *Nenad Marđetko, mag. ing. bioproc.*

Reviewers:

1. PhD Antonija Trontel, Assistant professor
2. PhD Mario Novak, Assistant professor
3. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor
4. PhD Jasna Novak, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 26 September 2019

| Sadržaj | stranica |
|---|-----------------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE..... | 2 |
| 2.2. ENZIMSKA HIDROLIZA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA | 4 |
| 2.2.1. Celulaze..... | 4 |
| 2.2.2. Ksilanaze | 5 |
| 2.2.3. Komercijalni enzimi za enzimsku hidrolizu lignoceluloznih sirovina | 6 |
| 2.3. PROIZVODNJA BIOETANOLA IZ LIGNOCELULOZNIH SIROVINA | 7 |
| 2.3.1. Mikroorganizmi za proizvodnju bioetanol..... | 7 |
| 2.3.2. Plijesan <i>Mucor indicus</i> | 9 |
| 2.3.3. Procesi proizvodnje bioetanol..... | 10 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 12 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 12 |
| 3.1.1. Sirovine | 12 |
| 3.1.2. Enzimi | 12 |
| 3.1.3. Mikroorganizam | 12 |
| 3.1.4. Kemikalije | 13 |
| 3.1.4.1. Priprema acetatnog pufera..... | 13 |
| 3.2. APARATURA I PRIBOR..... | 13 |
| 3.2.1. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. <i>High Pressure Liquid Chromatography, HPLC</i>)..... | 13 |
| 3.2.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (eng. <i>Ultra Performance Chromatography, UPLC</i>)..... | 14 |
| 3.2.3. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)..... | 14 |
| 3.2.4. Barbotirajući bioreaktor | 15 |
| 3.2.5. Ostala oprema..... | 15 |
| 3.3. METODE | 16 |
| 3.3.1. Određivanje celulazne i ksilanazne aktivnosti enzima | 16 |
| 3.3.2. Dvostupanjska kiselinska hidroliza | 17 |
| 3.3.3. Određivanje udjela netopivog lignina..... | 17 |
| 3.3.4. Određivanje udjela topivog lignina..... | 17 |
| 3.3.5. Određivanje ukupnih furana..... | 18 |
| 3.3.6. Analiza sastava sirovine..... | 18 |
| 3.3.7. Enzimsku hidrolizu kukuruznih oklasaka u Erlenmeyer tikvicama..... | 18 |
| 3.3.8. Određivanje koncentracije hidroliziranih šećera HPLC i UPLC metodom..... | 20 |
| 3.3.8.1. Priprema uzoraka i taloženje proteina..... | 20 |
| 3.3.8.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)..... | 20 |
| 3.3.8.3. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC)..... | 20 |
| 3.3.9. Priprema inokuluma plijesni <i>Mucor indicus</i> | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.10. Priprema hidrolizata za uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> | 21 |
| 3.3.11. Uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> i proizvodnja etanola u horizontalnom cijevnom bioreaktoru..... | 21 |
| 3.3.12. Uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> i proizvodnja etanola u barbotirajućem bioreaktoru..... | 21 |
| 3.4. IZRAČUN STUPNJA ENZIMSKE HIDROLIZE | 22 |
| 3.5. IZRAČUNAVANJE POKAZATELJA USPJEŠNOSTI RASTA I PROIZVODNJE ETANOLA | 23 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 24 |
| 4.1. ODREĐIVANJE CELULAZNE I KSILANAZNE AKTIVNOSTI ENZIMA | 26 |
| 4.1.1. Određivanje celulazne aktivnosti enzima..... | 26 |
| 4.1.2. Određivanje ksilanazne aktivnosti enzima..... | 27 |
| 4.2. ENZIMSKA HIDROLIZA PREDOBRAĐENIH KUKURUZNH OKLASAKA | 29 |
| 4.2.1. Enzimska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka s Viscozyme L | 30 |
| 4.2.2. Enzimska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka s Cellulase, enzyme blend | 36 |
| 4.2.3. Enzimska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka s Cellulase, enzyme blend i Viscozyme L | 42 |
| 4.3. UZGOJ PLIJESNI <i>Mucor indicus</i> I PROIZVODNJA ETANOLA NA HIDROLIZATU PREDOBRAĐENIH KUKURUZNH OKLASAKA | 49 |
| 4.3.1. Uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> i proizvodnja etanola na hidrolizatu predobrađenih kukuruznih oklasaka u HRCB-u..... | 50 |
| 4.3.2. Uzgoj plijesni <i>Mucor indicus</i> i proizvodnja etanola na hidrolizatu kukuruznih oklasaka u barbotirajućem bioreaktoru | 53 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 56 |
| 6. LITERATURA..... | 58 |
| 7. PRILOZI | |
| 7.1. Baždarni pravci za određivanje koncentracije ugljikohidrata i proizvoda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) | |
| 7.2. Baždarni pravci za određivanje koncentracije ugljikohidrata tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC) | |

1. UVOD

Otpadna lignocelulozna biomasa je jeftina, lako dostupna sirovina koja se ne koristi u ishrani stoke, a pogodna je za proizvodnju biokemikalija i biogoriva, poput bioetanola. Poželjne sirovine za održivu proizvodnju bioetanola su slama, kukuruzovina, kukuruzni oklasci, bagasa šećerne repe, trave, ostaci iz drvne industrije i dr. jer sadrže veliku količinu ugljikohidrata koji su odličan supstrat za rast većine kvasaca, bakterija i plijesni koje proizvode etanol. Glavne komponente lignocelulozne sirovine su celuloza, hemiceluloza i lignin koji su međusobno povezani u kompleksnu strukturu za čiju je razgradnju potrebno provesti učinkovitu predobradu (npr. kemijska, fizikalna, fizikalno-kemijska). Svrha predobrade je otvaranje te složene strukture i djelomična razgradnja polimera, te povećanje dodirne površine potrebne za djelovanje različitih enzima. Sastav lignoceluloze varira ovisno s korištenoj sirovini, a s obzirom na to potrebno je odabrati najbolju vrstu dostupnih enzima koji se primjenjuju za enzimsku hidrolizu. Najčešće se koriste mješavine celulaza i hemicelulaza dobivenih iz mikroorganizama kao što su *Trichoderma reesei* ili *Bacillus subtilis*. Iako primjena enzima olakšava razgradnju sirovine potrebo je racionalno korištenje enzima zbog cjelokupne cijene procesa. U većini biotehnoških procesa za proizvodnju etanola koriste se kvasci kao što je *Saccharomyces cerevisiae*, ali za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina korištenje plijesni ima određene prednosti. U svakoj biotehnoškoj proizvodnji nastoji se maksimalno iskoristiti sav potencijal određene sirovine te se iz tog razloga sve više istraživanja okreće prema mikroorganizmima koji mogu koristiti heksoze i pentoze uz dobar prinos etanola, npr. *Mucor indicus* (Goswami i Rawat, 2015; Limayem i Ricke, 2012; Millati i sur., 2008).

U ovom radu odredit će se aktivnost komercijalnih enzima, Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend te će se odrediti optimalna koncentracija enzima koja je potrebna za provođenje uspješne enzimske hidrolize kiselinski predobrađenih kukuruznih oklasaka. Također, na dobivenom hidrolizatu provest će se proizvodnja etanola pomoću plijesni *Mucor indicus* u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору (HRCB) i barbotirajućem bioreктору.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Lignoceluloza je osnovna komponenta biljaka koja se sastoji od tri polimera, celuloze, hemiceluloze i lignina. U lignocelulozne sirovine ubrajaju se trave, drveće, brzo rastuće energetske biljke kao što su miskantus, slama, kukuruzovina, kukuruzni oklasci i dr. (Kucharska i sur., 2018). Takva vrsta sirovine može se koristiti za održivu proizvodnju bioetanola i biokemikalija (Marđetko i sur., 2018). Lignocelulozni materijal koji se može koristiti za proizvodnju etanola može se podijeliti u šest skupina: ostatci usjeva (različite vrste slame, trska i slatki sirak, rižine ljuske, pulpa maslina), tvrdo (jasen, topola) i meko drvo (bor, smreka), celulozni otpad (otpadni papir), zeljasta biomasa (sijeno lucerne, trave) i čvrsti komunalni otpad (Bušić i sur., 2018). Polimeri koji su sastavni dio lignoceluloznih sirovina čine kompleksnu strukturu kao što je prikazano na slici 1. Takve sirovine predstavljaju kompleksan i teško razgradiv supstrat za enzime zbog sadržaja lignina koji štiti celulozu, ispreplitanja celuloze i hemiceluloze, visoke kristaličnosti i stupanja polimerizacije celuloze te zbog nepristupačne površine sirovina (Andlar i sur., 2018). Sastav lignoceluloznih sirovina prikazan je u tablici 1.

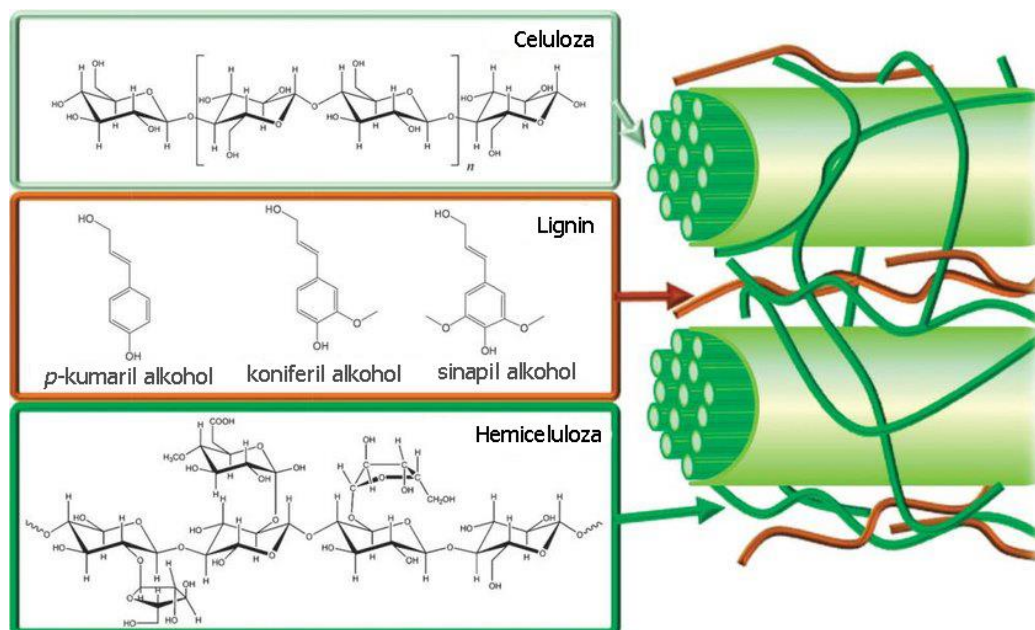
Tablica 1. Sastav nekih lignoceluloznih sirovina (Kucharska i sur., 2018).

| Sirovina | Celuloza [% w w ⁻¹] | Hemiceluloza [% w w ⁻¹] | Lignin [% w w ⁻¹] |
|------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Ječmena slama | 33,8 | 21,9 | 13,8 |
| Kukuruzni oklasci | 35,0 | 16,8 | 7,0 |
| Ostaci pamuka | 58,5 | 14,4 | 21,5 |
| Ostaci od prerade riže | 36,2 | 19,0 | 9,9 |
| Šećerna trska | 40,0 | 27,0 | 10,0 |
| Pšenična slama | 32,9 | 24,0 | 8,9 |

Celuloza je linearna strukturna komponenta biljnih stanica koja se sastoji od dugog lanca monomera glukoze povezanih β -1,4-glikozidnom vezom. Jaka i kompaktna kristalična struktura nastaje povezivanjem hidroksilnih skupina unutar istog i okolnih lanaca celuloze velikim brojem vodikovih veza (Limayem i Ricke, 2012).

Hemiceluloza je amorfni heteropolimer koji se sastoji od heksoza (D-glukoze, D-galaktoze, D-manoze) i pentoza (D-ksiloze i L-arabinoze) te može sadržavati D-glukuronsku, D-galaturonsku i metilgalakturonsku kiselinu. Jedinice D-ksiloze međusobno se povezuju β -1,4-glikozidnom vezom i čine okosnicu hemiceluloze (Limayem i Ricke, 2012). Osim toga, hemiceluloza je kovalentnim vezama povezana s ligninom i nekovalentnim vezama s celulozom što povećava stabilnost lignoceluloznih sirovina (Marđetko i sur., 2018). Bočni lanci koji se pojavljuju u strukturi određuju topljivost, fizičku konformaciju i reaktivnost ksilana s drugim komponentama hemiceluloze. Također, bočni lanci utječu na način i opseg enzimske razgradnje (Goswami i Rawat, 2015). Sastav šećera koji grade hemicelulozu može varirati te ovisi o vrsti biljke i uvjetima kultivacije (Kucharska i sur., 2018).

Lignin je amorfni heteropolimer koji se sastoji od tri monomera fenil propionskog alkohola, kumaril, koniferil i sinapil alkohola međusobno povezanih esterskim vezama te tako tvore umreženu trodimenzionalnu strukturu (Marđetko i sur., 2018). U strukturi lignoceluloznih sirovina, lignin je povezan s celulozom i hemicelulozom, a glavna mu je funkcija strukturna potpora, nepropusnost i otpornost na mikrobnii ili oksidativni stres biljne stanice (Andlar i sur., 2018; Kucharska i sur., 2018).



Slika 1. Prikaz strukture lignocelulozne sirovine (Alonso i sur., 2012).

2.2. ENZIMSKA HIDROLIZA LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Općenito, enzimaska hidroliza je razgradnja složenih polimernih ugljikohidrata na različite jednostavnije ugljikohidrate uz primjenu enzima. Kako bi enzimaska hidroliza lignoceluloznih sirovina bila uspješna prethodno je potrebno provesti učinkoviti predtretman sirovine. Predtretman može biti fizikalni (mehaničko usitnjavanje, piroliza, ultrazvuk), kemijski (ozonoliza, kiselinska ili alkalna hidroliza, tretman ionskim tekućinama), fizikalno-kemijski (eksplozija parom, eksplozija CO₂, AFEX) ili biološki (Kucharska i sur., 2018). Svrha predtretmana je povećanje poroznosti sirovine, uklanjanje lignina i hemiceluloze te smanjenje kristalčnosti celuloze. Najčešće se koristi kiselinski predtretman pomoću sumporne ili fosforne kiseline u kojem se usitnjena biomasa natopi kiselinom određene koncentracije pri određenoj temperaturi i vremenu. Tijekom navedenog predtretmana hemiceluloza se hidrolizira na mono- i oligosaharide, a celulozna vlakna bubre što olakšava daljnju razgradnju te se narušava struktura lignina. Kiselinski predtretman se može provoditi na temperaturi od 140 do 215 °C u trajanju od nekoliko sekundi do nekoliko minuta, a koncentracije kiseline koje se koriste su u rasponu od 0,5 do 10 % v v⁻¹ (Kucharska i sur., 2018; Marđetko i sur., 2018).

Kako bi se povećalo iskorištenje tijekom fermentacije često se dodatno koristi biološki predtretman koji uključuje primjenu enzima. Enzimaska hidroliza lignoceluloze je proces u kojem se netopljiv supstrat razgrađuje na čvrstu i tekuću fazu pomoću celulaza i sličnih enzima. Stupanj enzimske hidrolize ovisi o termostabilnosti enzima, temperaturi i pH na kojoj se provodi te ovisi o vrsti i koncentraciji supstrata (Pinaki i sur., 2015).

2.2.1. Celulaze

Celulaze su enzimi koji provode hidrolizu celuloze na jednostavne šećere, a mogu se podijeliti u nekoliko skupina: endoglukanaze, egzoglukanaze i β -glukozidaze. Endoglukanaze razgrađuju celulozna vlakna niskog stupnja kristalizacije pri čemu nastaju slobodni krajevi celuloznog lanca, egzoglukanaze razgrađuju krajeve lanca celuloze oslobađajući celobiozu, a β -glukozidaze hidroliziraju jedinice celobioze na glukozu (Bušić i sur., 2018). Povećanje količine celulaza u procesu povećava stupanj hidrolize, ali znatno poskupljuje cijeli proces. Enzimaska hidroliza pomoću celulaza najviše ovisi o nekoliko faktora koji su povezani s karakteristikama celuloze kao što su njena struktura, stupanj kristalizacije celuloze, dostupnost površine celuloze, stupanj polimerizacije i povezivanje s ligninom (Balat, 2011). Gljive koje su najviše istražene za proizvodnju celulaza pripadaju rodu *Trichoderma* (Sun i Cheng, 2002). *Trichoderma* vrste smatraju se najproduktivnijim mikroorganizmima za razgradnju celuloze, a *T. reesei* tijekom uzgoja može izlučiti do 100 g L⁻¹ enzima (Balat, 2011). Također, gljive koje

imaju celulaznu aktivnost mogu pripadati gljivama mekog, smeđeg ili bijelog truljenja. Neke plijesni koje izazivaju truljenje su *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Melanocarpus albomyces*, *Penicillium brasilianum*, *Trichoderma reesei*, *T. harzianum*, *Neurospora crassa*, *Mucor circinelloides* i *Trichoderma atroviride*. Gljivama smeđeg truljenja pripadaju *Coniophora puteana*, *Lanzites trabeum*, *Poria placenta*, *Tyromyces palustris*, a gljivama bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium*, *Sporotrichum thermophile*, *Trametes versicolor*, *Agaricus arvensis*, *Pleurotus ostreatus* i *Phlebia gigantea* (Kuhad i sur., 2011). U laboratorijskim istraživanjima najčešće se koristi koncentracija celulaza od 10 FPU g⁻¹ celuloze jer ta koncentracija omogućava oslobađanje visoke koncentracije glukoze u vremenu od 48 do 72 h. Aktivnost enzima ovisna je o temperaturi, celulaze najveću aktivnost pokazuju na 50±5 °C i pH 4,5 do 5, dok se na temperaturi oko 80 °C u potpunosti gubi aktivnost (Verardi i sur., 2012).

2.2.2. Ksilanaze

Hemiceluloza, sastavni dio lignoceluloznih sirovina, razgrađuje se pomoću ksilanaza koje pripadaju skupini glikozil hidrolaza. Ksilanaze su enzimi koji provode hidrolizu β-1,4-veza ksilana na jedinice ksiloze i ksilanooligosaharida. Ksilanaze se mogu podijeliti na tri načina, (1) prema molekularnoj masi i pI, (2) prema kristalnoj strukturi i (3) prema enzimskoj kinetici (Goswami i Rawat, 2015). Mjesto na kojem enzimi razgrađuju hemicelulozu ovisi o dužini lanca, stupnju grananja i prisutnosti supstituenata. Filamentozne gljive i plijesni proizvode više ksilanaza od kvasaca i bakterija, ali proizvodnja ovisi i o korištenoj podlozi i supstratu. Ksilanaze proizvedene pomoću bakterija i aktinomiceta (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp.) rade u rasponu pH vrijednosti od 5 do 9 jedinica i optimalnoj temperaturi između 35 i 60 °C. Za razliku od navedenih enzima, ksilanaze proizvedene pomoću plijesni (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp.) imaju veću aktivnost te su optimalni uvjeti ispod 50 °C i rasponu pH vrijednosti od 4 do 6 jedinica (Sharma i Sharma, 2018). Ako se kao supstrat koristi celuloza zajedno s dodatkom hemiceluloze *Trichoderma* i *Aspergillus* vrste mogu proizvoditi celulaze i ksilanaze, ali ako je upotrijebljen supstrat ksilan tada proizvode samo ksilanaze (Goswami i Rawat, 2015). *Bacillus* sp. proizvodi ksilanaze bez prisutnosti celulaza za što su potrebni neutralni ili alkalni uvjeti pH i viša temperatura te se iz tog razloga bakterijske ksilanaze koriste u industriji. Zbog nastojanja smanjenja proizvodnih troškova enzima, za proizvodnju se sve češće koriste lignocelulozne sirovine kao što su šećerna trska, pšenične mekinje, rižina slama, klip kukuruza, a mogu se iskoristiti i pšenična slama, rižine ljuske, kukurozovina i dr. (Sharma i Sharma, 2018). *Trichoderma reesei* i *Bacillus subtilis* su

vrste koje se komercijalno najčešće koriste za proizvodnju ksilanaza. Ksilanaze imaju primjenu u mnogim industrijama kao što su proizvodnja papira, hrane, tekstila, biogoriva i proizvodnji hrane za životinje. Također, ksilanaze se mogu koristiti u proizvodnji piva jer poboljšavaju ekstrakciju fermentabilnih šećera iz ječma ili u pekarskoj industriji kod enzimske hidrolize neškrobnih polisaharida jer se njihovom primjenom poboljšavaju reološka svojstva tijesta, specifični volumen kruha i čvrstoća mrvica (Goswami i Rawat, 2015).

2.2.3. Komercijalni enzimi za enzimsku hidrolizu lignoceluloznih sirovina

Za provođenje enzimske hidrolize koriste se lako dostupni komercijalni enzimi čiji su optimalni uvjeti za celulaze u rasponu pH od 4 do 5 i temperaturi od 50 °C. Celulolitički enzimi koji se najčešće koriste za razgradnju celuloze su Novozymov Celluclast dobiven iz gljive *Trichoderma reesei*. *Trichoderma reesei* proizvodi endoglukanaze i egzoglukanaze u velikim količinama dok je aktivnost β -glukozidaze mala (Verardi i sur., 2012) pa se iz tog razloga koristi u kombinaciji s Novozyme 188 koji sadrži β -glukozidazu dobivenu iz plijesni *Aspergillus niger*. Također, u primjeni su Novozyme Cellic CTec2 koji je kombinacija celulaza, hemicelulaza i β -glukozidaza i Cellic HTec2 koji sadrži celulaze i endoksilanaze koje razgrađuju hemicelulozu. Novozymov Viscozyme L je kombinacija celulaza, β -glukanaza, hemicelulaza, ksilanaza i arabinaza, a Cellulase, enzyme blend je zasebna kombinacija celulaza. Osim toga, poznatiji komercijalni Genencor enzimi su Accelerase 1500 koji sadrži kompleks egzoglukanaza, endoglukanaza, hemicelulaza i β -glukozidaza. Također, koriste se enzimi Accelerase XP koji razgrađuju ksilan i glukane, Accelerase XC koji posjeduje celulaznu i hemicelulaznu aktivnost te Accelerase BG koji sadrži samo β -glukozidaze (Verardi i sur., 2012).

2.3. PROIZVODNJA BIOETANOLA IZ LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Nakon provedene hidrolize lignoceluloznih sirovina, tekuća frakcija koja sadrži različite ugljikohidrate koristi se u bioprocima. Dobiveni hidrolizat smatra se potencijalnim održivim supstratom za proizvodnju biokemikalija poput etanola. Općenito, etanol se koristi u industriji alkoholnih pića, kao kemikalija u raznim industrijama ili u najsuvremenijoj primjeni kao biogorivo.

Za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina potrebno je provesti predtretman sirovine kako bi se sastojci biomase djelomično razgradili i bili lakše dostupni za idući korak enzimske hidrolize polisaharida u jednostavne šećere. Zatim se dobiveni hidrolizat koristi za proizvodnju etanola mikrobnom fermentacijom šećera, a za dobivanje etanola u određenom stupnju čistoće potrebna je njegova separacija i pročišćavanje (Bušić i sur., 2018).

2.3.1. Mikroorganizmi za proizvodnju bioetanola

Općenito, kako bi proizvodnja etanola bila isplativa, potrebno je da fermentacijski proces bude uspješan. Parametri kojim se može ocijeniti proces su prinos bioetanola koji bi trebao biti > 90 % od teoretskog i produktivnost proizvodnje bioetanola > 1 g L⁻¹ h⁻¹. Također, važno je da radni mikroorganizam bude otporan na inhibitore što mu omogućuje rast na hidrolizatima kao i da ima visoku toleranciju prema etanolu. Kada se proces provodi pri sniženoj pH vrijednosti ili pri povišenoj temperaturi, mogućnost kontaminacije s nepoželjnim mikroorganizmima je smanjena (Balat, 2011). Proizvodnja etanola na industrijskoj razini najčešće se provodi pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji može metabolizirati mono- i disaharide poput glukoze, fruktoze, maltoze i saharoze. Glavni nedostatak njegove primjene je nemogućnost metaboliziranja pentoza, ksiloze i arabinoze te bez prethodne razgradnje ne može koristiti celulozu i hemicelulozu (Bušić i sur., 2018; Marđetko i sur., 2018). Zbog tih nedostataka kvasac nije najbolji izbor za fermentaciju na lignoceluloznim hidrolizatima, ali tijekom proizvodnje bioetanola može se kombinirati s mikroorganizmima *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* ili *Fusarium oxysporum* koji mogu fermentirati pentoze. Međutim, navedeni mikroorganizmi proizvode etanol sporije u usporedbi s kvascem te podnose manje koncentracije kisika i etanola, nisu otporni na uvjete niskog pH i osjetljivi su na inhibitore (Aditya i sur., 2016). Iako može proizvoditi etanol, primjena filamentozne gljive *Fusarium oxysporum* se izbjegava zbog proizvodnje octene kiseline (Bušić i sur., 2018; Millati i sur., 2005). Također, navedeni nedostaci kvasca mogu se ukloniti metodama genetičkog inženjerstva te je sve veća primjena rekombinantnog kvasca *S. cerevisiae* koji posjeduje gene iz *P. stipitis* koji kodiraju za enzime potrebne za metaboliziranje pentoza (Balat, 2011). Nadalje,

kvasac *P. stipitis* je poželjan radni mikroorganizam zbog postizanja dobrog prinosa u proizvodnji etanola, ima visoku sposobnost fermentacije ksiloze, a određeni sojevi mogu fermentirati i celobiozu, glukozu, manozu i galaktozu. Nakon enzimske hidrolize lignoceluloznih sirovina pomoću komercijalnih enzima, koji često sadrže male količine β -glukozidaze, dolazi do nakupljanja celobioze i inhibicije celulaza. Zbog toga velika je prednost mogućnost fermentacije celobioze te se primjenom *P. stipitis* u SSF procesu umanjuje inhibicija enzima direktnim iskorištavanjem celobioze. Iako posjeduje značajne prednosti, primjena *P. stipitis* nije nadišla primjenu *S. cerevisiae* jer je brzina fermentacije ksiloze pomoću *P. stipitis* sporija u usporedbi s brzinom fermentacije glukoze pomoću *S. cerevisiae* (Selim i sur., 2018). Divlji sojevi *P. stipitis* ne mogu simultano metabolizirati glukozu i ksilozu, zbog toga je istražena primjena rekombinantnog kvasca *P. stipitis* BCC15191 koji može fermentirati ksilozu i glukozu (Selim i sur., 2018; Aditiya i sur., 2016). Prinos etanola na ksilozi pomoću *P. stipitis* može iznositi od 0,35 do 0,44 g g^{-1} , dok se na lignoceluloznim hidrolizatima postiže efikasnost oko 80 % od teoretskog prinosa (Selim i sur., 2018), dok efikasnost *S. cerevisiae* iznosi 90 do 93 % od teoretskog prinosa (Bušić i sur., 2018).

Osim kvasca, za efikasnu proizvodnju bioetanola iz glukoze, fruktoze i saharoze koristi se Gram negativna bakterija *Zymomonas mobilis*. Proizvodnjom etanola na glukozu i usporedbom rezultata s drugim radnim mikroorganizmom, pokazalo se da *Z. mobilis* može postići 5 % veći prinos u odnosu na *S. cerevisiae* uz efikasnost procesa od 97 % od teoretskog prinosa. *Z. mobilis* također ne može metabolizirati pentoze, ali u primjeni je rekombinantna bakterija koja posjeduje metabolički put ksiloze kao i *E. coli* te posjeduje GRAS status. Problem tijekom proizvodnje etanola pomoću navedene bakterije je proizvodnja polisaharida levana koji povećava viskoznost podloge te proizvodi sorbitol koji dodatno može smanjiti prinos procesa (Bušić i sur., 2018). Za proizvodnju bioetanola mogu se koristiti i termofilne anaerobne bakterije poput *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacter mathranii*, *Thermoanaerobium brockii* i *Clostridium thermosaccharolyticum*. Njihova prednost je što mogu podnositi visoke temperature i rasti na raznim jeftinim sirovinama, ali njihova industrijska primjena je ograničena zbog niske tolerancije bioetanola ($< 2\% \text{ v v}^{-1}$) (Balat, 2011).

Iako su kvasci najpoznatiji mikroorganizmi za fermentaciju šećera, sve više se pribjegava korištenju plijesni poput *Mucor indicus*. Razlog njihove primjene je potreba za postizanjem većih iskorištenja procesa koji se postižu zbog mogućnosti metaboliziranja više vrsta šećera. Također, primjenjuju se zbog potrebe za iskorištavanjem lignoceluloznih hidrolizata na kojima kvasci, zbog prisutnosti inhibitora, ne mogu efikasno provoditi proizvodnju bioetanola.

2.3.2. Plijesan *Mucor indicus*

Mucor indicus pripada koljenu *Zygomycota*, razredu *Zygomycetes*, redu *Mucorales* te porodici *Mucoraceae*. Početkom ovog stoljeća započela su istraživanja plijesni *Mucor indicus* kao mikroorganizma za industrijsku proizvodnju etanola i hitozana na lignoceluloznim sirovinama. Kao alternativa proizvodnji bioetanola pomoću kvasca, plijesan *Mucor indicus* može iskorištavati heksoze, ali značajna je prednost što iskorištava i ksilozu, koja je sastavni dio lignoceluloze. Također, spojevi koji su toksični za većinu mikroorganizama ili djeluju inhibitorno, poput octene kiseline, furfurala i 5-hidroksimetil furfurala (HMF), plijesan može iskoristiti. Specifičnost ovog mikroorganizma je dimorfizam jer ovisno o uvjetima ima sposobnost rasta u filamentoznom obliku i u obliku kvasca. Osim toga, proizvodi etanol u aerobnim i anaerobnim uvjetima (Karimi i Zamani, 2013; Millati i sur., 2008). *M. indicus* proizvodi etanol iz heksoza poput glukoze, manoze, fruktoze i galaktoze, a ksilozu može koristiti u aerobnim i mikroaerofilnim uvjetima. U uvjetima kada je u podlozi prisutna glukoza i ksiloza, *M. indicus* najprije koristi glukozu kao izvor ugljika za proizvodnju etanola. Nakon iskorištenja glukoze, koristi ksilozu te se takav način rasta naziva diauksični rast. U ovom slučaju glukoza inhibira potrošnju ksiloze, međutim u odsutnosti šećera plijesan može koristiti etanol kao izvor ugljika za svoj rast (Karimi i Zamani, 2013). Prema autorima Millati i sur. (2008) navedena plijesan proizvodi etanol u podlozi s 50 g L⁻¹ šećera i aeraciji 0,2 vvm. Iz toga proizlazi da je *M. indicus* Crabtree pozitivan mikroorganizam jer proizvodi etanol u aerobnim uvjetima u prisutnosti povišene koncentracije šećera (Millati i sur., 2008). Također, potvrđeno je da *M. indicus* ne može koristiti ksilozu u anaerobnim uvjetima te prinos etanola na ksilozi ovisi o aeraciji (Millati i sur., 2008).

Primjer uspješne proizvodnje etanola je proizvodnja simultanom saharifikacijom i fermentacijom jer *M. indicus* može rasti i proizvoditi etanol pri 38 °C, što je blizu optimalne temperature hidrolitičkih enzima (Karimi i Zamani, 2013). Također, prema istraživanjima proizvodnja etanola na hidrolizatu rižine slame u anaerobnim uvjetima, odvojenom hidrolizom i fermentacijom, daje prinos etanola od 0,36 do 0,43 g g⁻¹ i 0,11 do 0,17 g g⁻¹ biomase. Jednakim načinom proizvodnje (SSF proces) na hidrolizatu drva smreke i breze u pilot postrojenju u air lift reaktoru, prinos etanola iznosi 0,33 g g⁻¹ i 0,40 g g⁻¹ (Karimi i Zamani, 2013). Prema Millati i sur. (2005) usporedbom proizvodnje etanola pomoću *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor* vrsta, uočeno je da *M. indicus* najbrže proizvodi etanol na ksilozi u usporedbi s drugim testiranim mikroorganizmima. Od nusprodukata prilikom uzgoja na ksilozi, *Mucor indicus* proizvodi glicerol, male količine octene (0,002 g g⁻¹), ali ne proizvodi mliječnu kiselinu (Millati i sur., 2005).

Osim proizvodnje etanola, *M. indicus* je zanimljiv mikroorganizam jer njegova stanična stijenka sadrži relativno visoke koncentracije netoksičnog polimera hitozana koji ima primjenu u farmaceutskoj, prehrambenoj industriji i poljoprivredi. Također, iz hitozana se može proizvesti vrijedan produkt, glukozamin koji ima medicinsku primjenu u terapiji osteoartritisa i za pospješivanje zacjeljivanja rana. Nadalje, navedena plijesan proizvodi lipide koji se mogu iskoristiti u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, a posjeduju i potencijal za proizvodnju biodizela (Sharifyazd i Karimi, 2017; Abedinifar i sur., 2009).

2.3.3. Procesi proizvodnje bioetanola

Proizvodnja bioetanola može se provesti na dva načina, kao odvojena hidroliza i fermentacija (eng. *separate hydrolysis and fermentation*, SHF) ili simultana saharifikacija i fermentacija (eng. *simultaneous saccharification and fermentation*, SSF). Nakon predtretmana sirovina, tekuća faza, koja sadrži šećere, odvaja se od krute faze koja sadrži lignin i daje polimerne ugljikohidrate. Primjenom SHF procesa, odvojene hidrolize i fermentacije, koriste se optimalni uvjeti oba procesa jer se svaki odvija zasebno. Optimalna temperatura hidrolize za većinu komercijalnih enzima je 50 °C, a fermentacija ovisi o korištenom organizmu, za kvasac od 28 do 32 °C. Za fermentaciju pentoza i heksoza koriste se zasebni mikroorganizmi jer mikroorganizmi koji metaboliziraju pentoze rade puno sporije te su osjetljiviji na etanol i inhibitore od mikroorganizama koji koriste heksoze (Bušić i sur., 2018). Određeni šećeri koji nastaju tijekom hidrolize mogu djelovati inhibitorno na celulaze (Pinaki i sur., 2015) što u konačnici dovodi do potrebe za većim koncentracijama enzima kako bi se postigao željeni prinos procesa (Balat, 2011). Već male koncentracije do 6 g L⁻¹ celobioze mogu smanjiti celulaznu aktivnost za 60 % (Bušić i sur., 2018). Osim toga, nedostatak SHF procesa je dugo trajanje svake faze procesa i potreba za većim kapitalnim ulaganjima (Pinaki i sur., 2015).

Razlika SSF procesa, simultane hidrolize i fermentacije, u usporedbi s SHF procesom je što hidrolizirane šećere istovremeno koristi radni mikroorganizam, odnosno hidroliza i fermentacija provode se u jednom bioreaktoru (Pinaki i sur., 2015). *T. resei* i *S. cerevisiae* su najčešći mikroorganizmi koji se koriste za ovu vrstu procesa. Glavna prednost SSF procesa je povećanje stupnja hidrolize zbog smanjenja inhibicije celulaza. Ovakav proces zahtijeva manje enzima, kraće vrijeme procesa, smanjuje se cijena procesa te se dobiva veći prinos etanola (Bušić i sur., 2018; Pinaki i sur., 2015). Zbog simultanog rada, ovaj način umanjuje inhibitorni učinak celobioze jer su u reaktoru prisutne male koncentracije šećera. Optimalne temperature hidrolize i fermentacije se znatno razlikuju, a ovakav proces provodi se na 38 °C što je glavni

nedostatak ovog procesa. Također, nedostatak je inhibicija radnog mikroorganizma i enzima etanolom (Bušić i sur., 2018).

Noviji način proizvodnje etanola je integracija fermentacije pentoza u SSF proces, odnosno simultana saharifikacija i kofermentacija (eng. *simultaneous saccharification and cofermentation*, SSCF). Ovakav proces zahtijeva približne optimalne uvjete temperature i pH za oba radna mikroorganizma, a ujedno smanjuje kapitalne troškove zbog kofermentacije (Bušić i sur., 2018). Primjer uspješne kofermentacije za proizvodnju etanola je proces proveden pomoću *C. shehatae* i *S. cerevisiae* (Pinaki i sur., 2015). Još jedna mogućnost je direktna mikrobna konverzija ili proizvodnja celulaza, hidroliza i fermentacija pomoću jednog mikroorganizma što se naziva konsolidirano bioprocesiranje (eng. *consolidated bioprocessing*, CBP). Takav proces smanjuje troškove proizvodnje enzima za hidrolizu, a bakterije istražene za ovaj proces su *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacter mathranii*, *Thermoanaerobium brockii* i *Clostridium thermosaccharolyticum*. Navedene termofilne celulolitičke anaerobne bakterije mogu koristiti razne supstrate za proizvodnju etanola, ali značajan problem njihove primjene predstavlja mala tolerancija etanola (Pinaki i sur., 2015).

Zadnji korak proizvodnje bioetanola je pročišćavanje koje se sastoji od destilacije te dehidracije etanola. U prvom koraku dobiva se 92,5 do 94 % etanola, dok se u idućem koraku destilacijom uz promjenu tlaka ili azeotropnom destilacijom dobiva bezvodni etanol (Bušić i sur., 2018). Novija istraživanja usmjerena su na optimizaciju adsorpcijskih i membranskih procesa za uspješno pročišćavanje bioetanola.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovine

Kukuruzni oklasci korišteni u ovom radu prethodno su kiselinski predobrađeni s 0,5 % H₂SO₄ u visokotlačnom reaktoru na 180 °C kroz 10 min u sklopu HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“.

3.1.2. Enzimi

Za određivanje celulazne i ksilanazne aktivnosti enzima te za enzimsku hidrolizu predobrađenih kukuruznih oklasaka korišteni su:

Viscozyme L (Novozyme, Danska) – mješavina celulolitičkih enzima, sinonim: lizirajući enzimi iz *Aspergillus* sp.

Cellulase, enzyme blend (Sigma-Aldrich, Njemačka) – mješavina celulolitičkih enzima, sinonim: Cellic CTec2.

3.1.3. Mikroorganizam

U ovom radu, kao radni mikroorganizam, korištena je plijesan *Mucor indicus* iz zbirke mikroorganizama „*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*“ (DSMZ, Braunschweig, Njemačka).

3.1.4. Kemikalije

Tablica 2. Popis kemikalija korištenih za izradu rada.

| Kemikalija | Čistoća | Proizvođač |
|---------------------------|------------------------------|--------------------|
| diamonijev fosfat | p.a. | Gram-mol, Hrvatska |
| diamonijev sulfat | p.a. | Gram-mol, Hrvatska |
| D-(+)-glukoza | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| kvašičev ekstrakt | za upotrebu u biotehnologiji | Merck, Njemačka |
| mesni ekstrakt | za upotrebu u biotehnologiji | Merck, Njemačka |
| octena kiselina | za upotrebu u biotehnologiji | Alkaloid, Skopje |
| natrijev acetat trihidrat | p.a. | Merck, Njemačka |
| pepton | za upotrebu u biotehnologiji | Merck, Njemačka |
| Tween 80® | p.a. | Merck, Njemačka |
| fosfatna kiselina | p.a. | Fluka, Njemačka |
| sumporna kiselina | min. 96%, p.a. | Kemika, Hrvatska |
| cinkov sulfat heptahidrat | p.a. | Merck, Njemačka |
| etanol | p.a. | Gram-mol, Hrvatska |
| demineralizirana voda | p.a. | - |

3.1.4.1. Priprema acetatnog pufera

Za pripremu 100 mL acetatnog pufera pH 4,8 korišteno je 20 mL 0,2 M otopine octene kiseline i 30 mL 0,2 M natrijevog acetata trihidrata te je tikvica dopunjena demineraliziranom vodom.

3.2. APARATURA I PRIBOR

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

Kromatograf Shimadzu CLASS-VP LC10AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan) sastoji se od pumpe (LC-10ADVP), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10 ADVP), uređaja za grijanje kolone (CTO-10AVP), ionsko-izmjenjivačke analitičke kolone (Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 µm) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 µm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-19AVP) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).

3.2.2. Sustav za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (eng. *Ultra Performance Chromatography, UPLC*)

Uređaj tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti, (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) sastoji se od crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), uzorkivača (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H⁺, Phenomenex) dimenzija 150 x 7,8 mm s odgovarajućim pretkOLONAMA, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS).

3.2.3. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)

HRCB sastoji se od nosača, bioreaktora izrađenog od nehrđajućeg čelika, elektromotora i kontrolne jedinice. Nosač bioreaktora podupire posudu bioreaktora čime omogućava njenu rotaciju preko osovine koju pokreće elektromotor. Kontrolna jedinica omogućuje regulaciju broja okretaja bioreaktora i intervalno uključivanje/isključivanje rotacije. Bioreaktor se rotira pomoću elektromotora snage 0,9 kW. Maksimalni broj okretaja reaktora iznosi 60 min⁻¹. Opisani bioreaktor nema regulaciju temperature i pH vrijednosti, a ukupni volumen iznosi 30 L. Bioreaktor ima ugrađena dva lopatasta miješala duljine 0,6 m i širine 0,04 m učvršćena na unutrašnju stijenku HRCB-a. Sterilizacija se provodi direktnom parom. Bioreaktor ima dva mjesta za izuzimanje uzoraka: za izuzimanje tekuće faze i za izuzimanje čvrste faze (slika 2).



Slika 2. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB).

3.2.4. Barbotirajući bioreaktor

Barbotirajući bioreaktor je stakleni reaktor dimenzija 15 x 30 cm gdje se izmiješavanje podloge provodi sa zrakom preko prstenaste sapnice promjera 5 cm koja je udaljena 2 cm od dna bioreaktora. Protok kroz prstenastu sapnicu kontrolira se preko aerometra. Barbotirajući bioreaktor je povezan s komandnom pločom (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Njemačka) preko koje se provodi automatska regulacija temperature te pH vrijednosti.

3.2.5. Ostala oprema

- analitička vaga Shimadzu (Kyoto, Japan);
- tehnička vaga Tehtnica (Železniki, Slovenija);
- autoklav Sutjeska;
- pH metar 744, Metrohm (Herisau, Švicarska);
- sušionik Instrumetarija ST-50 (Zagreb, Hrvatska);
- magnetna mješalica Cimarec iTM Poly15 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Thermo-Shaker TS-100 (BioSan, Latvija)
- ultrazvučna kupelj USC300T (VWR International, Leuven, Belgija)
- UV/Vis spektrofotometar Cary 100, (Agilent Technologies, SAD)
- staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka)
- eppendorf kivete
- najlonski filteri promjera pora 0,2 µm
- Büchnerov lijevak
- Erlenmeyer tikvice
- tikvice s okruglim dnom
- Petrijeve zdjelice

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje celulazne i ksilanazne aktivnosti enzima

Za određivanje celulazne aktivnosti (FPU) u Eppendorf kivete stavljeno je 50 mg filter papira (1x6 cm) zajedno s 1 mL acetatnog pufera pH 4,8 pripremljenog kao što je opisano u poglavlju 3.1.4.1. Kivete s filter papirom i puferom zagrijane su u termostatu 10 min na 50 °C. Pomoću pufera pripremljena su razrjeđenja komercijalnih enzima, Viscozyme L (vol vol⁻¹) 0,1 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,8 % i 5 % te za Cellulase, enzyme blend (vol vol⁻¹) 0,1 %, 0,2 %, 0,4 %, 0,6 % te 1 %. U kivete je dodano 0,5 mL razrijeđenog enzima i stavljeno na inkubaciju 60 min na 50 °C. Nakon 60 min reakcija je zaustavljena zagrijavanjem u vreloj vodi oko 15 min. Taloženje proteina iz uzoraka provedeno je cinkovim sulfatom (poglavlje 3.3.8.1.) te su pripremljeni uzorci analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti kao što je opisano u poglavlju 3.3.8.2. Celulazna aktivnost izračunata je pomoću formule 1. Za kontrolu enzima proveden je isti postupak s 1 mL pufera i 0,5 mL razrijeđenog enzima (2 % vol vol⁻¹) te za kontrolu supstrata 1,5 mL pufera i 50 mg filter papira. Svi uzorci rađeni su u dvije paralele.

Formula za izračun celulazne aktivnosti enzima [FPU mL⁻¹]:

$$FPU = \frac{0,37}{w_{enzima}} \quad [1]^*$$

w_{enzima} – volumni postotak enzima pri kojem se oslobodi 2 g L⁻¹ glukoze

*(Adney i Baker, 1996)

Za određivanje ksilanazne aktivnosti (KA) kao supstrat je dodano 50 mg ksilana. Pomoću pufera pripremljena su razrjeđenja komercijalnih enzima, Viscozyme L (vol vol⁻¹) 5 %, 1 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 %, 0,2 % i 0,1 % te za Cellulase, enzyme blend (vol vol⁻¹) 5 %, 1 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 %. Svi ostali koraci jednaki su postupku za određivanje celulazne aktivnosti enzima. Ksilanazna aktivnost izračunata je prema formuli 2.

Formula za izračun ksilanazne aktivnosti enzima [U mL⁻¹]:

$$KA = \frac{0,44}{w_{enzima}} \quad [2]$$

w_{enzima} – volumni postotak enzima pri kojem se oslobodi 2 g L⁻¹ ksiloze

3.3.2. Dvostupanjska kiselinska hidroliza

Dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom analiziran je sastav filter papira korištenih kao supstrat za određivanje celulazne aktivnosti enzima i sastav predobrađene sirovine koja je korištena u ovom radu. Postupak je proveden zbog određivanja koncentracije ugljikohidrata i lignina topivog i netopivog u kiselini.

U tikvicu s okruglim dnom dodano je 0,4 g uzorka i 4 mL 72 %-tne H₂SO₄. Sadržaj je inkubiran jedan sat na temperaturi od 30 °C, zatim je dodano 111 mL demineralizirane vode te su uzorci kuhani 4 sata uz povratno hladilo. Sadržaj u tikvici je povremeno miješan protresanjem tikvice kako bi se ostvario što bolji kontakt sirovine i kiseline i kako bi se smanjili gubici zbog hvatanja sirovine za stijenke tikvice. Nakon kuhanja, uzorak je ohlađen pod mlazom vode te profiltriran kroz celulozni filter papir preko Büchnerovog lijevaka. Iz čvrstog dijela sirovine zaostalog na filter papiru određen je lignin netopljiv u kiselini, a u filtratu je određena koncentracija topivog lignina, ukupnih furana (HMF i furfural) te je određena koncentracija šećera HPLC metodom.

3.3.3. Određivanje udjela netopivog lignina

Isprani čvrsti dio nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize prebačen je u osušenu i izvaganu Petrijevu zdjelicu te je stavljen na sušenje na temperaturu od 105 °C kroz 24 h. Nakon sušenja uzorak je ponovno izvagan te je određen netopivi udio lignina prema formuli 3.

$$w(LNTK) = \frac{m(\text{osušeni filter s talogom}) - m(\text{filtera})}{m(\text{uzorak čvrste faze uzetog za analizu})} \quad [3]$$

3.3.4. Određivanje udjela topivog lignina

Određivanje topivog lignina provedeno je u filtratu nakon dvostupanjske hidrolize mjerenjem apsorbancije spektrofotometrom pri valnoj duljini od 205 nm. Uzorak je razrijeđen demineraliziranom vodom kako bi apsorbancija iznosila između 0,7 i 1 te je udio lignina topivog u kiselini izračunat prema formuli 4.

$$w(LTK) = \frac{A * D * V}{a * b * m} * 100 \quad [4]$$

A - apsorbancija uzorka na 205 nm

a - konstanta, 110 gL⁻¹cm⁻¹

D - faktor razrjeđenja

m - masa uzorka uzetog za analizu [g]

V - volumen filtrata [L]

3.3.5. Određivanje ukupnih furana

Određivanje ukupnih furana provedeno je u filtratu nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Uzorak je razrijeđen u omjeru 1:1000 te je izmjerena apsorbancija spektrofotometrom pri 284 nm i 320 nm. Koncentracija je izračunata prema jednadžbi baždarnog pravca: $\gamma_{\text{furani}} = 2,496 \cdot \Delta A + 0,0158$; $R^2 = 0,998$.

3.3.6. Analiza sastava sirovine

Sastav kukuruznih oklasaka i filter papira određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (postupak u poglavlju 3.3.8.2), a udio lignina određen je dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom. Postupak dvostupanjske kiselinske hidrolize opisan je u poglavlju 3.3.2., a sastav sirovine i filter papira prikazan je u tablici 3.

Tablica 3. Sastav glavnih komponenata kukuruznih oklasaka i filter papira određenih dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom.

| sirovina | W_{glukan} [%] | W_{ksilan} [%] | W_{arabitan} [%] | W_{LTK} [%] | $W_{\text{NLTk+pepel}}$ [%] | Furani [mg/L] |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------|
| kukuruzni oklasci | 69,26 | 7,07 | 0,00 | 2,00 | 12,87 | 0,03 |
| filter papir | 71,47 | 16,55 | 1,03 | 6,34 | 2,50 | 0,03 |

LTK - lignin topiv u kiselini; LNTK - lignin netopiv u kiselini

3.3.7. Enzimska hidroliza kukuruznih oklasaka u Erlenmeyer tikvicama

Enzimska hidroliza usitnjenih i osušenih predobrađenih kukuruznih oklasaka provedena je pomoću komercijalnih enzima Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend. Postupak enzimske hidrolize proveden je u ukupnom volumenu od 50 mL. U Erlenmeyer tikvicu odvagana je odgovarajuća količina predobrađenih kukuruznih oklasaka (10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} , 40 g L^{-1}), dodan je acetatni pufer (pH 4,8), tikvice su zatvorene vatenim čepom i sterilizirane. Nakon hlađenja dodano je 1 % (vol vol⁻¹), 10 % (vol vol⁻¹) ili 20 % (vol vol⁻¹) enzima na ukupan volumen. Dodatak enzima u sterilnu suspenziju kukuruznih oklasaka i izuzimanje uzoraka za daljnju analizu provedeno je u sterilnim uvjetima.

Kako bi se odredili optimalni uvjeti enzimske hidrolize predobrađenih kukuruznih oklasaka provedeni su eksperimenti u kojem je istražen utjecaj koncentracije dodanog enzima (Viscozyme L, Cellulase, enzyme blend i kombinacija navedenih enzima) i supstrata (tablica 4,

tablica 5). Svi eksperimenti provedeni su na temperaturi od 50 °C u acetatnom puferu pH 4,8 na magnetnoj miješalici. Izuzimani su uzorci od 1 mL prvih 8 sati te nakon 24 h i 48 h.

Tablica 4. Koncentracije enzima i supstrata korištenih za enzimsku hidrolizu predobrađenih kukuruznih oklasaka pomoću Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend (T=50 °C; pH 4,8).

| Enzim [% vol vol ⁻¹] | Supstrat [g L ⁻¹] | Oznaka |
|----------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| 1 | 10 | Vis 1_10; CB 1_10 |
| | 20 | Vis 1_20; CB 1_20 |
| | 40 | Vis 1_40; CB 1_40 |
| 10 | 10 | Vis 10_10; CB 10_10 |
| | 20 | Vis 10_20; CB 10_20 |
| | 40 | Vis 10_40; CB 10_40 |
| 20 | 10 | Vis 20_10; CB 20_10 |
| | 20 | Vis 20_20; CB 20_20 |
| | 40 | Vis 20_40; CB 20_40 |

Vis – Viscozyme L; CB – Cellulase, enzyme blend

Tablica 5. Koncentracije enzima i supstrata korištenih za enzimsku hidrolizu predobrađenih kukuruznih oklasaka uz mješavinu enzima (T=50 °C; pH 4,8).

| Enzim [% vol vol ⁻¹] | | Supstrat [g L ⁻¹] | Oznaka |
|----------------------------------|----|-------------------------------|-----------|
| Vis | CB | | |
| 1 | 1 | 10 | 1%_1%_10 |
| | | 20 | 1%_1%_20 |
| | | 40 | 1%_1%_40 |
| 2 | 5 | 10 | 2%_5%_10 |
| | | 20 | 2%_5%_20 |
| | | 40 | 2%_5%_40 |
| 5 | 10 | 10 | 5%_10%_10 |
| | | 20 | 5%_10%_20 |
| | | 40 | 5%_10%_40 |

Vis – Viscozyme L; CB – Cellulase, enzyme blend

3.3.8. Određivanje koncentracije hidroliziranih šećera HPLC i UPLC metodom

3.3.8.1. Priprema uzoraka i taloženje proteina

U izuzetim uzorcima najprije je zaustavljena enzimska reakcija zagrijavanjem u Thermo-Shakeru na 95 °C 10 min te su zatim uzorci centrifugirani 10 min. Uzeto je 750 µL supernatanta i dodano 750 µL cinkovog sulfata (100 g L⁻¹) za taloženje proteina. Centrifugiranjem 10 min izdvojeni su istaloženi proteini, a dobiveni supernatant je profiltriran pomoću šprice s najlonskim filterom promjera pora 0,2 µm. Ovako pripremljeni uzorci analizirani su HPLC ili UPLC metodom.

3.3.8.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Kromatografski sustav Shimadzu CLASS-VP LC-10AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan) korišten je za određivanje koncentracije glukoze, ksiloze i celobioze u uzorcima enzimske hidrolize (za Cellulase, enzyme blend i kombinaciju komercijalnih enzima) i koncentracije šećera i etanola tijekom uzgoja plijesni *M. indicus*. Za analizu je injektirano 20 µL uzorka u sustav uz protok mobilne faze od 0,5 mL min⁻¹. Kao mobilna faza korištena je 0,1 % otopina fosforne kiseline. Temperatura ionsko – izmjenjivačke analitičke kolone (Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 µm) s predkolonom (Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 µm) zagrijavana je na 55 °C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma (RID, eng. *Refractive Indeks Detector*). Obrada dobivenih kromatograma napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10). Koncentracije u uzorcima izračunate su iz baždarnih pravaca koji se nalaze u prilogu.

3.3.8.3. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) korištena je za određivanje koncentracije glukoze, ksiloze i celobioze u uzorcima enzimske hidrolize pomoću Viscozyme L. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 µL, a kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline uz protok 0,6 mL min⁻¹. Analitička kolona (Rezex ROA-Organic Acid H+, Phenomenex) s pretkolonom zagrijavana je na 55 °C. Za detekciju je korišten detektor indeksa loma (G7162A 1260 RID), a obrada kromatograma napravljena je pomoću računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Koncentracije u uzorcima izračunate su iz baždarnih pravaca koji se nalaze u prilogu.

3.3.9. Priprema inokuluma plijesni *Mucor indicus*

Prije uzgoja pripremljeno je 250 mL podloge za inokulum. Za pripremu podloge korišteno je 40 g L⁻¹ glukoze, 5 g L⁻¹ diamonijevog sulfata, 5 g L⁻¹ diamonijevog fosfata, 10 g L⁻¹ mesnog ekstrakta i demineralizirana voda. Tako pripremljena podloga za inokulum je inkubirana 24 h pri 30 °C uz miješanje na tresilici.

3.3.10. Priprema hidrolizata za uzgoj plijesni *Mucor indicus*

Za pripremu hidrolizata za uzgoj plijesni u barbotirajućem bioreaktoru u 1 L acetatnog pufera pH 4,8 dodano je 40 g L⁻¹ usitnjenih predobrađenih kukuruznih oklasaka te je suspenzija zatvorena vatenim čepom i sterilizirana. Nakon sterilizacije i hlađenja dodano je 2 % vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5 % vol vol⁻¹ Viscozyme L te je enzimska hidroliza provedena tijekom 3 dana na temperaturi od 50 °C uz miješanje na magnetnoj miješalici. Dobiveni hidrolizat je profiltriran preko Büchnerovog lijevka te je za daljnje postupke korišten supernatant. U supernatant je dodano 2 g L⁻¹ diamonijevog fosfata, 2 g L⁻¹ diamonijevog sulfata, 5 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta i demineralizirana voda da ukupni volumen iznosi 1,3 L. Tako pripremljena otopina je sterilizirana.

Priprema hidrolizata za uzgoj plijesni u horizontalnom cijevnom bioreaktoru provedena je jednako kao u gore opisanom postupku za ukupni volumen hidrolizata od 4 L.

3.3.11. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* i proizvodnja etanola u horizontalnom cijevnom bioreaktoru

U horizontalni cijevni bioreaktor (HRCB) dodan je pripremljeni hidrolizat (4 L) kukuruznih oklasaka (poglavlje 3.3.10.) u aseptičnim uvjetima te je zatim dodana porasla suspenzija plijesni. Uzgoj je vođen bez aeracije samo uz rotaciju bioreaktora od 20 min⁻¹. pH tijekom uzgoja nije korigiran, a uzorci su izuzimani tijekom 72 h te analizirani HPLC metodom opisanom u poglavlju 3.3.8. Rast plijesni praćen je mikroskopiranjem, a na kraju uzgoja cijeli sadržaj bioreaktora je profiltriran preko Büchnerovog lijevka te je biomasa osušena i izvagana radi određivanja konačne koncentracije biomase.

3.3.12. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* i proizvodnja etanola u barbotirajućem bioreaktoru

U barbotirajući bioreaktor dodan je pripremljeni hidrolizat (1,3 L) kukuruznih oklasaka (poglavlje 3.3.10.) u aseptičnim uvjetima te je dodana porasla suspenzija plijesni. Uzgoj je vođen uz aeraciju 0,5 L min⁻¹ što je omogućilo i miješanje sadržaja bioreaktora. Temperatura je održavana na 28 °C, pH tijekom uzgoja nije korigiran, a pjenjenje je održavano dodatkom

ulja. Uzorci su izuzimani tijekom 24 h i analizirani HPLC metodom opisanom u poglavlju 3.3.8. Rast plijesni je praćen mikroskopiranjem kao i u HRCB-u te je na jednak način određena konačna koncentracija biomase u bioreaktoru.

3.4. IZRAČUN STUPNJA ENZIMSKE HIDROLIZE

Stupanj enzimske hidrolize (SH)

$$SH_{glukana\ u\ glukozu} = \frac{m_1 (glukoza)}{m_2 (monomera)} [\%] \quad [5]$$

m_1 – masa oslobođene glukoze u određenom vremenu hidrolize [g]

m_2 - teoretska masa monomera koja se može postići hidrolizom glukana iz sirovine [g]

$$SH_{ksilana\ u\ ksilozu} = \frac{m_1 (ksiloza)}{m_2 (monomera)} [\%] \quad [6]$$

m_1 – masa oslobođene ksiloze u određenom vremenu hidrolize [g]

m_2 - teoretska masa monomera koja se može postići hidrolizom ksilana iz sirovine [g]

$$SH_{ukupnih\ UH/sirovina} = \frac{m_1 (uk\ UH)}{m_2 (sirovina)} [\%] \quad [7]$$

m_1 – masa ukupnih ugljikohidrata oslobođenih u određenom vremenu hidrolize [g]

m_2 - teoretska masa sirovine [g]

3.5. IZRAČUNAVANJE POKAZATELJA USPJEŠNOSTI RASTA I PROIZVODNJE ETANOLA

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

$$Y_{P/S} = \frac{(P-P_0)}{(S_0-S)} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Y_P}{\Delta S} \quad [\text{g g}^{-1}] \quad [8]$$

S_0, P_0 - početna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g L^{-1}],

S, P - konačna koncentracija supstrata, odnosno produkta [g L^{-1}].

Maksimalna brzina nastanka produkta (r_P)

$$\ln P = \ln P_0 + r_P \cdot t \quad [\text{h}^{-1}] \quad [9]$$

Efikasnost procesa (E)

$$E = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S}(\text{teoretski})} \times 100 \quad [\%] \quad [10]$$

Produktivnost proizvodnje produkta (P_r)

$$P_r = \frac{P-P_0}{t_u} \quad [\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}] \quad [11]$$

t_u - ukupno vrijeme trajanja uzgoja

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu određena je aktivnost komercijalnih enzima, Viscozyme L (Novozyme) i Cellulase, enzyme blend (Sigma-Aldrich) te je provedena enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka s koncentracijama navedenih enzima od 1 % vol vol⁻¹, 10 % vol vol⁻¹ i 20 % vol vol⁻¹. Koncentracije supstrata za enzimsku hidrolizu iznosile su 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ i 40 g L⁻¹. Također, provedena je hidroliza pomoću kombinacije navedenih enzima u koncentracijama (vol vol⁻¹) od 1 % Viscozyme L i 1 % Cellulase, enzyme blend; 2 % Viscozyme L i 5 % Cellulase, enzyme blend te 5 % Viscozyme L i 10 % Cellulase, enzyme blend s jednakim koncentracijama supstrata kao prilikom hidrolize sa zasebnim enzimima. Glavni sastojak korištenih kukuruznih oklasaka je celuloza koja se razgrađuje pomoću celulaza, a prema Abedinifar i sur. (2009) celulaze pokazuju najbolju aktivnost oko pH 5, a prema specifikacijama proizvođača, optimalna temperatura za Cellulase, enzyme blend je 45-55 °C. Zbog navedenog, za enzimsku hidrolizu odabrana je temperatura od 50 °C i acetatni pufer pH 4,8. Provedenim eksperimentima utvrđena je najučinkovitija kombinacija koncentracije supstrata i enzima za provedbu uspješne enzimске hidrolize predobrađenih kukuruznih oklasaka. Optimalnom kombinacijom supstrata i enzima priređen je hidrolizat koji je korišten za uzgoj plijesni *Mucor indicus*.

Za uzgoj plijesni *Mucor indicus* i proizvodnju etanola provedena je odvojena hidroliza i fermentacija u HRCB-u i barbotirajućem bioreктору. Kao što je već navedeno u poglavlju 2.3.1., *Mucor indicus* je mikroorganizam koji može proizvoditi etanol iz čistih šećera, a sve se više istražuje proizvodnja na složenim lignoceluloznim sirovinama, poput hidrolizata predobrađenih kukuruznih oklasaka korištenih u ovom radu. Tijekom uzgoja praćena je potrošnja šećera i proizvodnja etanola HPLC metodom.

Rezultati provedenih istraživanja podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

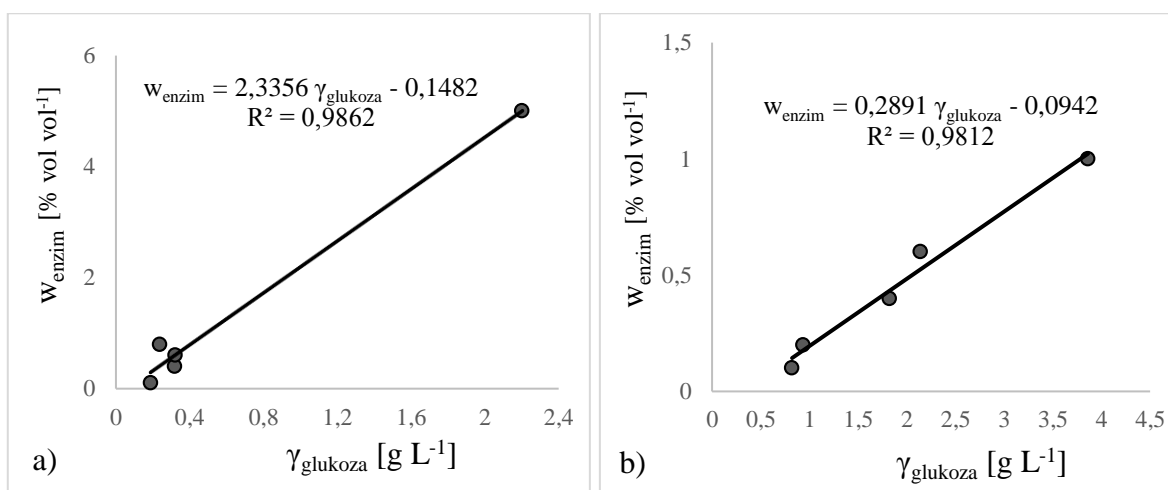
- 1. Određivanje celulazne i ksilanazne aktivnosti enzima (Poglavlje 4.1.)**
 - a. Određivanje celulazne aktivnosti (Poglavlje 4.1.1.);
 - b. Određivanje ksilanazne aktivnosti (Poglavlje 4.1.2.);
- 2. Enzimska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka (Poglavlje 4.2.)**
 - a. Enzimska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka s Viscozyme L (Poglavlje 4.2.1.);
 - b. Enzimska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka s Cellulase, enzyme blend (Poglavlje 4.2.2.);
 - c. Enzimska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka s Cellulase, enzyme blend i Viscozyme L (Poglavlje 4.2.3.);
- 3. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* i proizvodnja etanola na hidrolizatu predobrađenih kukuruznih oklasaka (Poglavlje 4.3.)**
 - a. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* i proizvodnja etanola na hidrolizatu kukuruznih oklasaka u HRCB-u (Poglavlje 4.3.1.);
 - b. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* i proizvodnja etanola na hidrolizatu kukuruznih oklasaka u barbotirajućem bioreктору (Poglavlje 4.3.2.);

4.1. ODREĐIVANJE CELULAZNE I KSILANAZNE AKTIVNOSTI ENZIMA

Celulazna i ksilanazna aktivnost je određena kao što je opisano u poglavlju 3.3.1., a za definiranje celulazne aktivnosti enzima korištene su jedinice „filter paper units“ (FPU), odnosno aktivnost pri kojoj se oslobodi 2 g L^{-1} glukoze iz 50 mg filter papira u 60 min . Pri određivanju aktivnosti korištene su i kontrole enzima i supstrata jer komercijalni enzimi mogu sadržavati određenu koncentraciju šećera koja nije nastala enzimskom razgradnjom supstrata. Dobivene koncentracije šećera su korigirane za dobivene vrijednosti kontrole. Ksilanazna aktivnost enzima definirana je kao aktivnost pri kojoj se oslobodi 2 g L^{-1} ksiloze iz 50 mg ksilana u 60 min .

4.1.1. Određivanje celulazne aktivnosti enzima

Pošto su komercijalni enzimi zapravo mješavina više različitih vrsta enzima, a specifikacije ne daju točne informacije o njihovim aktivnostima, određena je celulazna aktivnost odabranih enzima. Također, određena je aktivnost enzima kako bi se u kasnijim eksperimentima lakše odredile potrebne koncentracije za hidrolizu lignocelulozne sirovine. Na temelju dostupnih informacija o sastavu odabranih mješavinama enzima očekivana je značajna razlika celulazne aktivnosti enzima. Rezultati određivanja aktivnosti prikazani su na slici 3 u obliku baždarnih dijagrama iz kojih je izračunata aktivnost enzima.

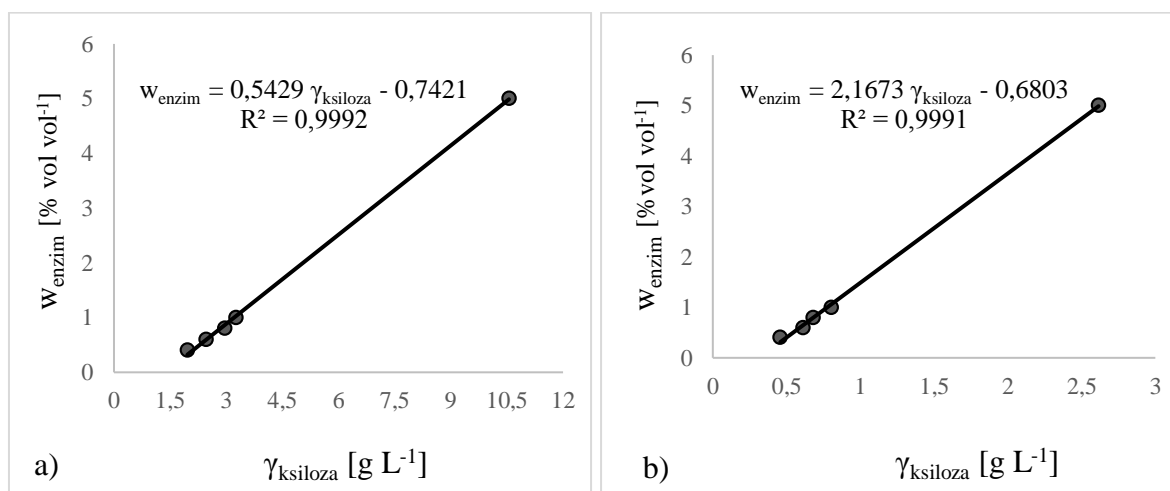


Slika 3. Baždarni dijagram za određivanje celulazne aktivnosti enzima: a) FPU Viscozyme L; b) FPU Cellulase, enzyme blend. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8.

Iz priređenih baždarnih dijagrama prikazanih na slici 3 izračunata je koncentracija enzima pri kojoj se oslobodi 2 g L^{-1} glukoze te je izračunata aktivnost enzima kao što je navedeno u poglavlju 3.3.1. Navedena koncentracija šećera oslobodi se primjenom $4,52 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L što daje aktivnost od $8,18 \text{ FPU mL}^{-1}$. Dok je za Cellulase, enzyme blend potrebno $0,48 \text{ \% vol vol}^{-1}$ enzima za postizanje jednake koncentracije glukoze te prema tome celulazna aktivnost iznosi $76,45 \text{ FPU mL}^{-1}$. Iz rezultata može se zaključiti da Viscozyme L posjeduje nisku celulaznu aktivnost. Dobivena aktivnost za Cellulase, enzyme blend može se usporediti s aktivnosti od 84 FPU mL^{-1} dobivene pomoću Celluclast 1.5 FG L korištenog za hidrolizu pšenične slame (Rodrigues i sur., 2015). Također prema Abedinifar i sur. (2009), često korišteni komercijalni celulazni enzimi, BTXL iz *T. reesei*, pokazuju nešto nižu aktivnost, 55 FPU mL^{-1} , od testiranog Cellulase, enzyme blenda.

4.1.2. Određivanje ksilanazne aktivnosti enzima

Kao i za celulaznu aktivnost, ksilanazna aktivnost je određena zbog nedovoljnih informacija o točnoj vrijednosti aktivnosti enzima i kako bi se u kasnijim eksperimentima lakše odredile potrebne koncentracije za hidrolizu lignocelulozne sirovine. Na temelju dostupnih informacija o sastavu odabranih komercijalnih enzima, koje su navedene u kasnijim rezultatima, očekivana je značajna razlika ksilanazne aktivnosti enzima. Rezultati određivanja aktivnosti prikazani su na slici 4 u obliku baždarnih dijagrama iz kojih je izračunata aktivnost enzima.



Slika 4. Baždarni dijagram za određivanje ksilanazne aktivnosti enzima: a) Viscozyme L; b) Cellulase, enzyme blend. Uvjeti $50 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 4,8.

Slika 4 prikazuje dobivene baždarne dijagrame za određivanje ksilanazne aktivnosti korištenih komercijalnih enzima. Viscozyme L već pri koncentraciji od $0,34 \text{ \% vol vol}^{-1}$

oslobodi 2 g L^{-1} ksiloze što daje aktivnost enzima od $128,02 \text{ U mL}^{-1}$. Za postizanje jednake koncentracije ksiloze potrebno je $3,65 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, enzyme blend a te je ksilanazna aktivnost navedene mješavine enzima manja i iznosi $12,04 \text{ U mL}^{-1}$. Za usporedbu, komercijalni enzimi Celluclast 1.5 L i Novozyme 188 posjeduju puno veću ksilanaznu aktivnost od testiranih enzima u ovom radu. Celluclast 1.5 L ima ksilanaznu aktivnost od 905 U mL^{-1} , a enzimi Novozyme 188 imaju aktivnost od 605 U mL^{-1} (Saha i sur., 2005).

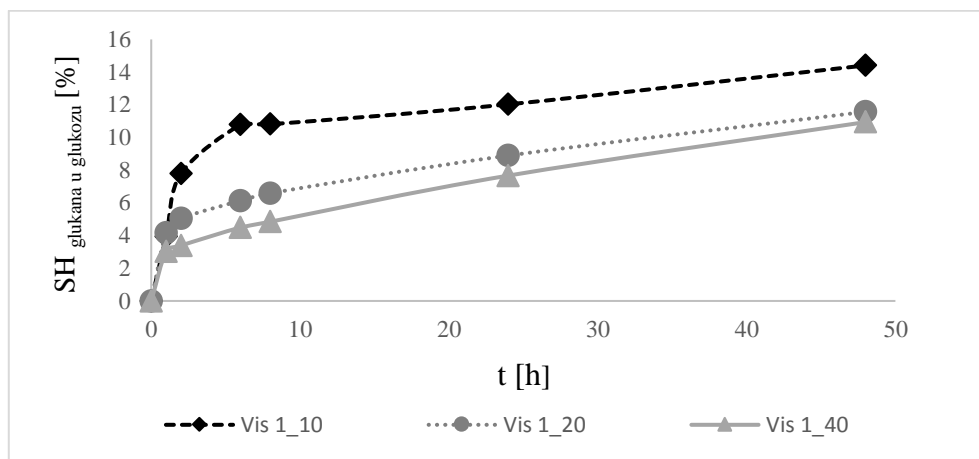
Prema specifikacijama korištenih enzima Cellulase, enzyme blend sadrži celulaze, β -glukozidaze i hemicelulaze specifične za razgradnju celuloze, a Viscozyme L sadrži širok spektar karbohidraza kao što su arabinaze, celulaze, β -glukanaze, hemicelulaze i ksilanaze. Analizom rezultata dobivena je 9 puta veća celulazna aktivnost Cellulase, enzyme blend a u usporedbi s Viscozyme L. Zbog navedenog sastava komercijalnih enzima očekivan je takav rezultat. Također, za Viscozyme L je navedeno da sadrži ksilanaze što potvrđuju i rezultati ksilanazne aktivnosti koji su 10 puta veći u usporedbi s Cellulase, enzyme blend. Cellulase, enzyme blend sadrži malu količinu ksilanaza jer pokazuje određenu ksilanaznu aktivnost.

4.2. ENZIMSKA HIDROLIZA PREDOBRAĐENIH KUKURUZNIH OKLASAKA

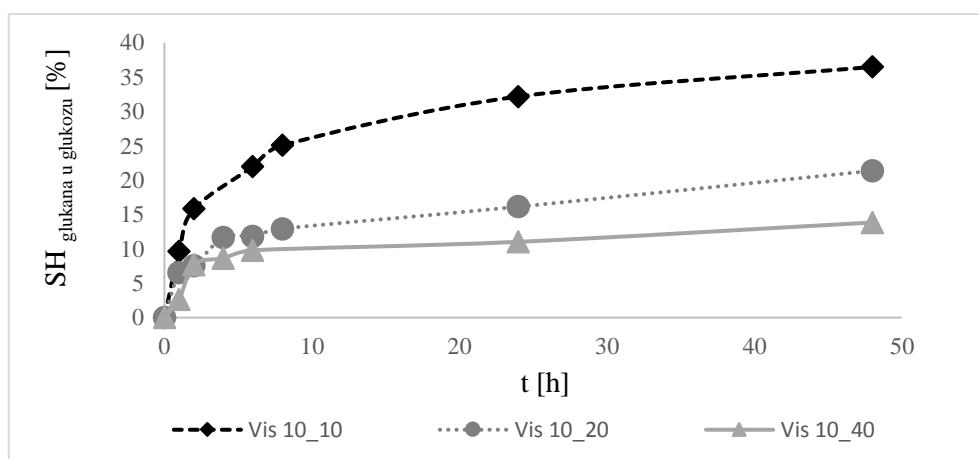
Enzimsku hidrolizu kiselinom predobrađenih kukuruznih oklasaka (0,5 % H_2SO_4 , 180 °C, 10 min) provedena je prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.8. Kukuruzni oklasci pripadaju u skupinu lignoceluloznih sirovina za čiju se razgradnju najviše koriste celulaze. Zbog toga su za enzimsku hidrolizu odabrani komercijalni enzimi, Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend, koji se koriste za navedenu vrstu sirovine. Kako bi se odredili optimalni uvjeti za enzimsku hidrolizu provedeni su eksperimenti s različitim koncentracijama enzima i supstrata. Ispitane su koncentracije: 1 % vol vol⁻¹, 10 % vol vol⁻¹ i 20 % vol vol⁻¹ enzima (Viscozyme ili Cellulase, enzyme blend) te 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ i 40 g L⁻¹ usitnjenih predobrađenih kukuruznih oklasaka (tablica 4). Također, ispitano je međudjelovanje navedenih enzima s koncentracijama prikazanim u tablici 5. Nadalje, važno je napomenuti da u sastav kukuruznih oklasaka ulazi i lignin na koji se može vezati enzim, ali takvo povezivanje je neproduktivno jer smanjuje dostupnost enzima prema celulozi (Limayem i Ricke, 2012). Enzimsku hidrolizu je provedena u acetatnom puferu pH 4,8 na 50 °C uz miješanje na magnetnoj miješalici 150 min⁻¹. Zbog različitog sastava komercijalnih enzima eksperimenti su provedeni s dvije enzimске mješavine kako bi se utvrdilo koja postiže bolji stupanj hidrolize.

4.2.1. Enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka s Viscozyme L

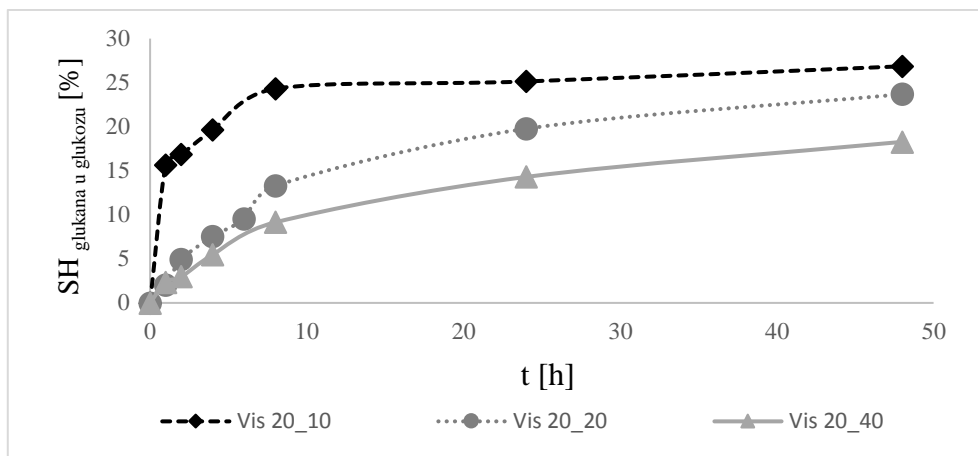
Enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka provedena je pomoću Viscozyme L kako bi se odredio stupanj hidrolize koji se može postići primjenom navedene mješavine enzima te kako bi se odredilo koji je od odabranih enzima bolji za enzimsku hidrolizu. Ispitan je efekt povećanja koncentracije enzima i supstrata na ukupnu enzimsku hidrolizu odabrane sirovine. Rezultati stupnjeva hidrolize prikazani su u ovisnosti o vremenu zasebno za hidrolizu glukana (slika 5a, 5b, 5c), ksilana (slika 6a, 6b, 6c) i za hidrolizu ukupnih ugljikohidrata/sirovinu (slika 7a, 7b, 7c).



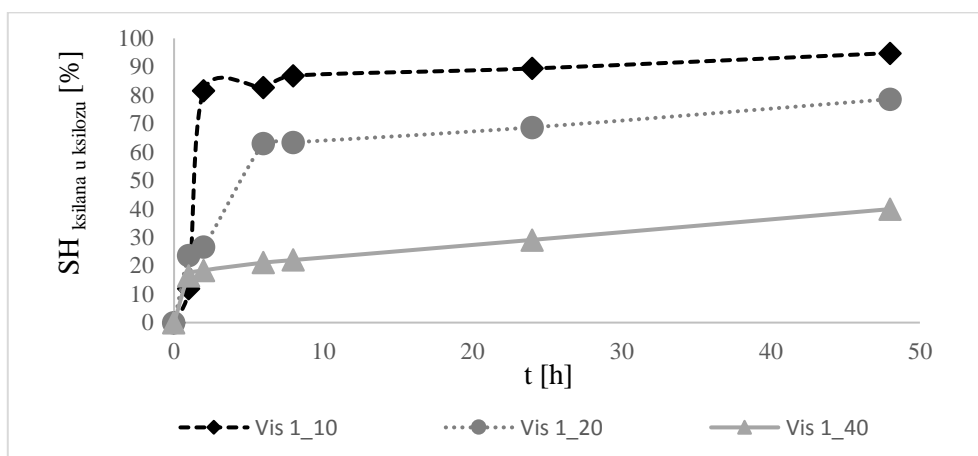
Slika 5a. Prikaz rezultata enzimске hidrolize glukana u glukozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Viscozyme L.



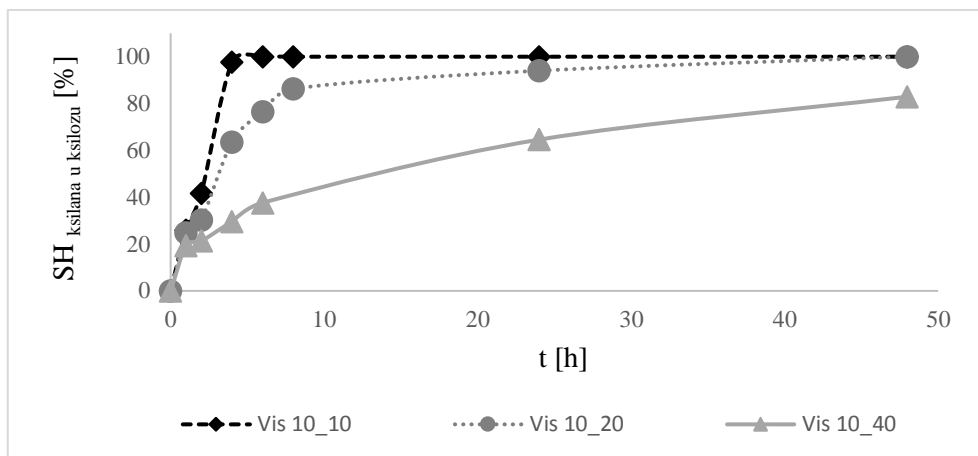
Slika 5b. Prikaz rezultata enzimске hidrolize glukana u glukozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $10 \text{ \% vol vol}^{-1}$. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Viscozyme L.



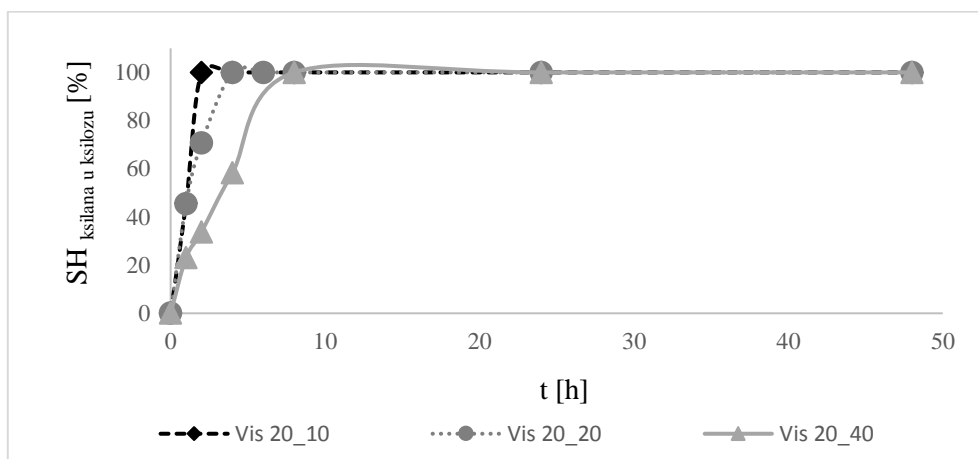
Slika 5c. Prikaz rezultata enzimske hidrolize glukana u glukozu provedene s 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ i 40 g L⁻¹ predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od 20 % vol vol⁻¹. Uvjeti: 50 °C; pH 4,8; enzim – Viscozyme L.



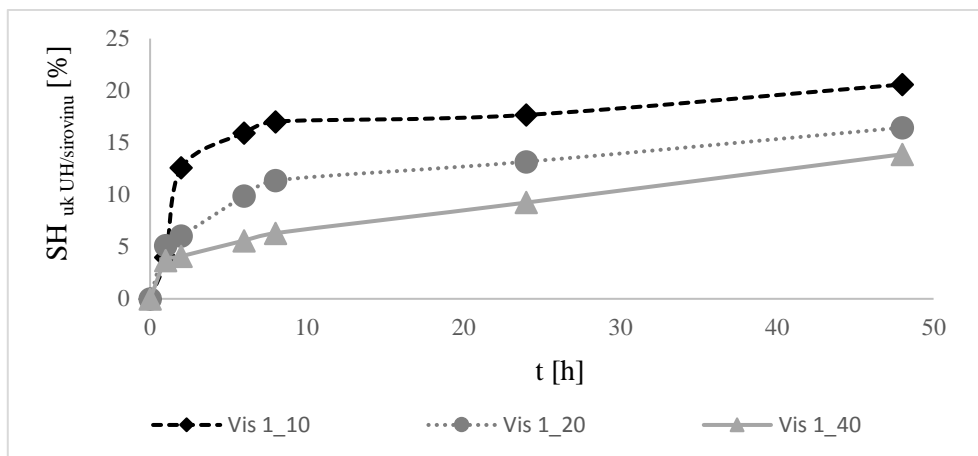
Slika 6a. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ksilana u ksilozu provedene s 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ i 40 g L⁻¹ predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od 1 % vol vol⁻¹. Uvjeti: 50 °C; pH 4,8; enzim – Viscozyme L.



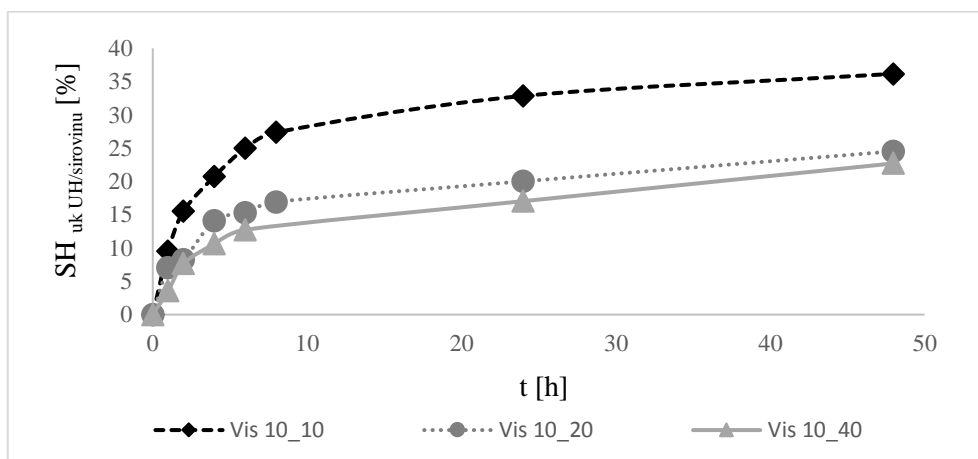
Slika 6b. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ksilana u xsilozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $10 \text{ \% vol vol}^{-1}$.
Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Viscozyme L.



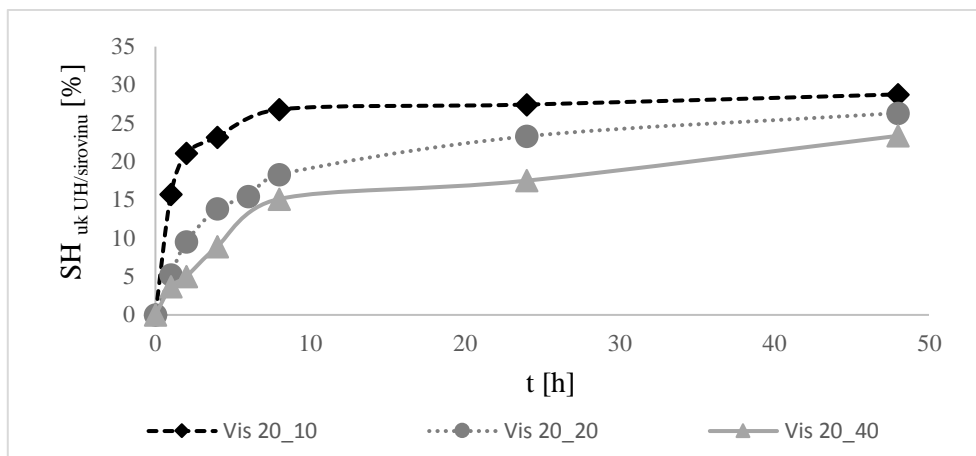
Slika 6c. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ksilana u xsilozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $20 \text{ \% vol vol}^{-1}$.
Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Viscozyme L.



Slika 7a. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ukupnih ugljikohidrata/sirovinu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Viscozyme L.



Slika 7b. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ukupnih ugljikohidrata/sirovinu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $10 \text{ \% vol vol}^{-1}$. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Viscozyme L.



Slika 7c. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ukupnih ugljikohidrata/sirovinu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $20 \text{ \% vol vol}^{-1}$. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Viscozyme L.

HPLC analizom određen je sastav korištenih kukuruznih oklasaka koji sadrže 69,26 % glukana, 7,07 % ksilana i 2,00 % lignina. Iz glukana i ksilana enzimskom hidrolizom mogu se dobiti glukoza i ksiloza, dok sastojci degradacije lignin mogu djelovati negativno na celulolitičke enzime (Limayem i Ricke, 2012).

Nakon provedbe enzimske hidrolize predobrađenih kukuruznih oklasaka (PKO) s $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L postignut je stupanj hidrolize glukana od 14,41 % za 10 g L^{-1} PKO, 11,57 % za 20 g L^{-1} PKO i 10,94 % za 40 g L^{-1} PKO (slika 5a). Enzimskom hidrolizom 10 g L^{-1} PKO i povećanjem koncentracije enzima na $10 \text{ \% vol vol}^{-1}$ dobiven je stupanj hidrolize glukana od 36,47 % (slika 5b). Daljnjim povećanjem koncentracije enzima na $20 \text{ \% vol vol}^{-1}$, uz jednaku koncentraciju supstrata, dovelo je do pada stupnja hidrolize glukana na 26,86 % (slika 5c).

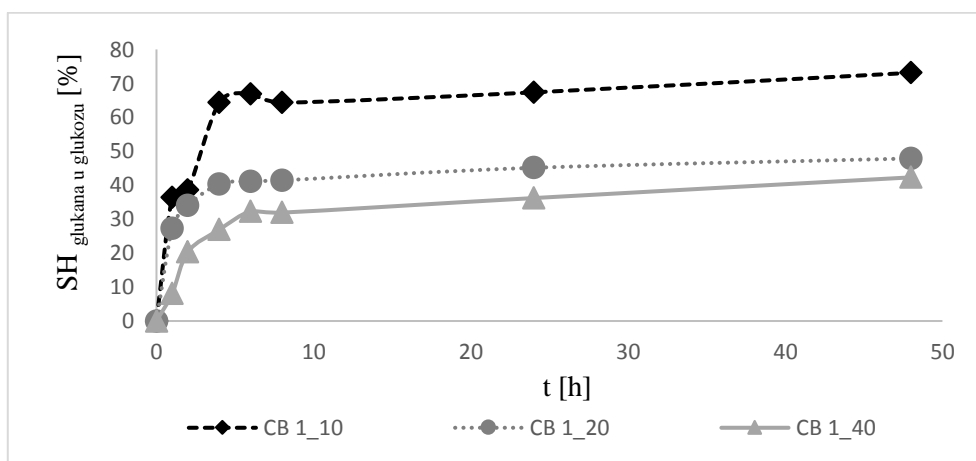
U eksperimentu provedenim s $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L s početnom koncentracijom supstrata od 10 g L^{-1} dobiven je stupanj hidrolize ksilana od 94,82 %. Povećanjem koncentracije supstrata na 40 g L^{-1} uvelike utječe na smanjenje stupnja hidrolize glukana na 39,93 % (slika 6a). Povećanjem koncentracije enzima na $10 \text{ \% vol vol}^{-1}$ postignuti su maksimalni mogući stupnjevi hidrolize ksilana (100 %) kod 10 g L^{-1} i 20 g L^{-1} supstrata, dok je samo hidrolizom 40 g L^{-1} PKO postignut nešto manji stupanj hidrolize ksilana od 82,91 % (slika 6b). Također, u eksperimentu provedenim s $20 \text{ \% vol vol}^{-1}$ enzima i 10 g L^{-1} supstrata postignut je stupanj hidrolize ksilana od 100 % unutar 2 h, dok je povećanje koncentracije supstrata na 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} utjecalo na povećanje vremena hidrolize na 4 h i 8 h za postizanje jednakog stupnja hidrolize (slika 6c). Sahare i sur. (2012) proveli su enzimsku hidrolizu kukuruznih oklasaka

pomoću *Penicillium* celulaza te je povećanje koncentracije supstrata jednako utjecalo na povećanje vremena hidrolize ukupnih ugljikohidrata.

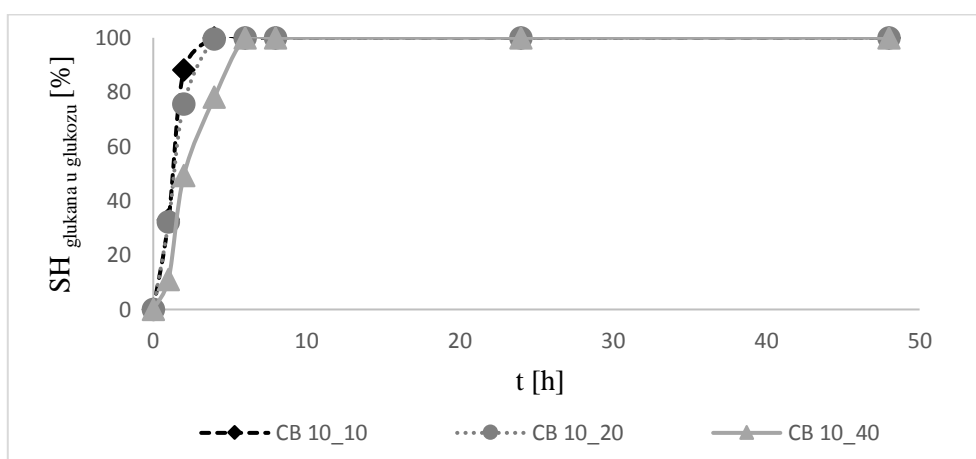
U svim eksperimentima enzimske hidrolize pomoću Viscozyme L dobiven je puno veći stupanj hidrolize ksilana od stupnja hidrolize glukana što je vidljivo usporedbom slika 5 i slika 6. Razlog takvog rezultata je što Viscozyme L sadrži veću koncentraciju ksilanaza od celulaza što se slaže i s rezultatima određivanja ksilanazne i celulazne aktivnosti. Iako su postignuti visoki stupnjevi hidrolize ksilana, zbog malih stupnjeva hidrolize glukana, hidroliza ukupnih ugljikohidrata je u niskom rasponu od 13,89 % (1 % vol vol⁻¹ enzima i 40 g L⁻¹ supstrata; slika 7a) do 36,16 % (10 % vol vol⁻¹ enzima i 10 g L⁻¹ supstrata). Povećanjem koncentracije enzima s 10 % vol vol⁻¹ (slika 7b) na 20 % vol vol⁻¹ (slika 7c) postignuti su gotovo jednaki stupnjevi hidrolize ukupnih ugljikohidrata. Za usporedbu, Sahare i sur. (2012) proveli su enzimsku hidrolizu alkalno predobrađenih kukuruznih oklasaka pomoću komercijalnih enzima Palkofeel-30 i AccelleraseTM1000 koji posjeduju približnu ksilanaznu aktivnost kao Viscozyme L. Hidrolizom provedenom s Palkofeel-30 (5 FPU g⁻¹ supstrata) dobiven je stupanj enzimske hidrolize u rasponu od 39 % (2,5 % supstrata) do 19 % (7,5 % supstrata), dok je povećanje enzima na 20 FPU g⁻¹ supstrata dovelo do povećanja stupnja hidrolize na 61 % (2,5 % supstrata) i 39 % (7,5 % supstrata). Hidrolizom 2,5 % supstrata pomoću 20 FPU g⁻¹ AccelleraseTM1000 postignuta je 100 %-tna hidroliza, ali povećanjem supstrata na 7,5 % dovelo je do značajnog smanjenja hidroliza na 39 % (Sahare i sur., 2012).

4.2.2. Enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka s Cellulase, enzyme blend

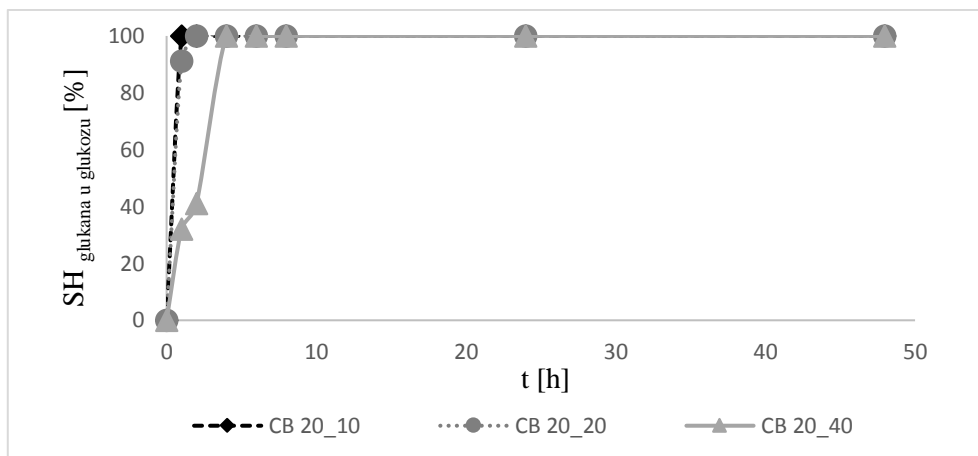
Enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka provedena je pomoću Cellulase, enzyme blend kako bi se odredio stupanj hidrolize koji se može postići primjenom navedene mješavine enzima te da se uspoređi uspješnost enzimske hidrolize s drugim odabranim komercijalnim enzimom. Ispitan je efekt povećanja koncentracije enzima i supstrata na ukupnu enzimsku hidrolizu odabrane sirovine. Rezultati stupnjeva hidrolize prikazani su u ovisnosti o vremenu zasebno za hidrolizu glukana (slika 8a, 8b, 8c), ksilana (slika 9a, 9b, 9c) i za hidrolizu ukupnih ugljikohidrata/sirovinu (slika 10a, 10b, 10c).



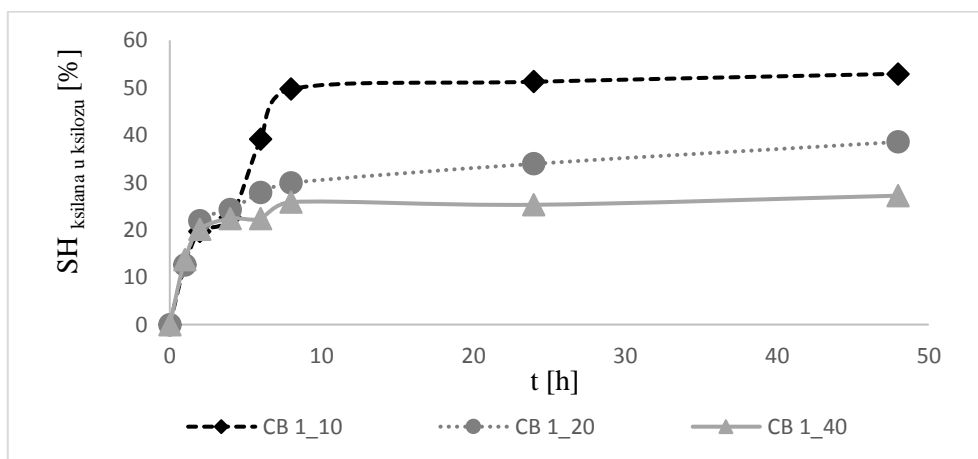
Slika 8a. Prikaz rezultata enzimske hidrolize glukana u glukozu provedene s 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ i 40 g L⁻¹ predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od 1 % vol vol⁻¹. Uvjeti: 50 °C; pH 4,8; enzim – Cellulase, enzyme blend.



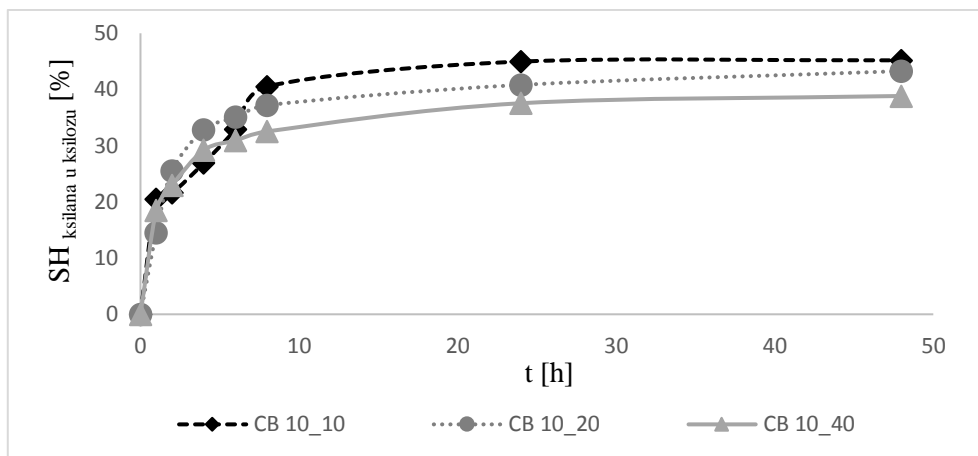
Slika 8b. Prikaz rezultata enzimske hidrolize glukana u glukozu provedene s 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ i 40 g L⁻¹ predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od 10 % vol vol⁻¹. Uvjeti: 50 °C; pH 4,8; enzim – Cellulase, enzyme blend.



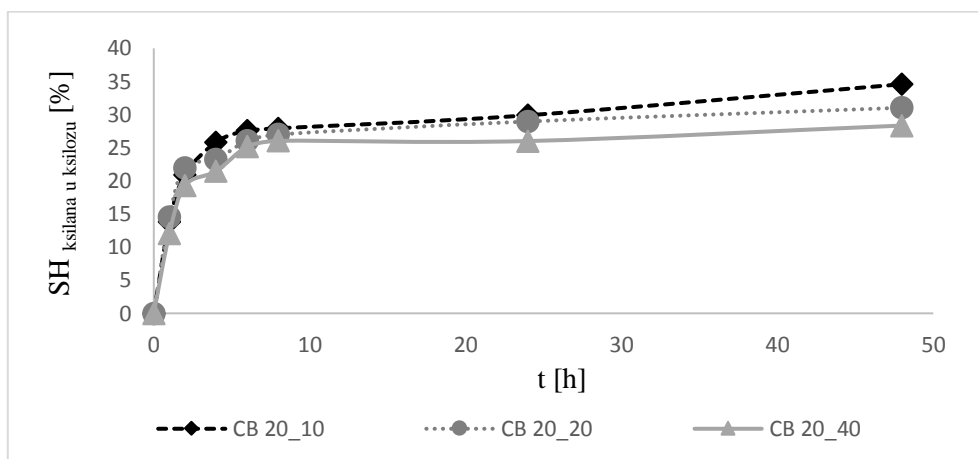
Slika 8c. Prikaz rezultata enzimske hidrolize glukana u glukozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $20 \text{ \% vol vol}^{-1}$. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Cellulase, enzyme blend.



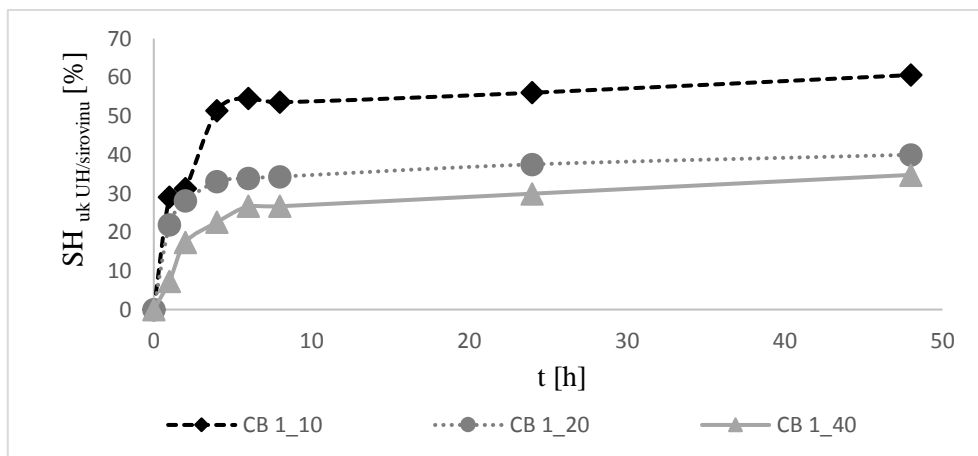
Slika 9a. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ksilana u ksilozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Cellulase, enzyme blend.



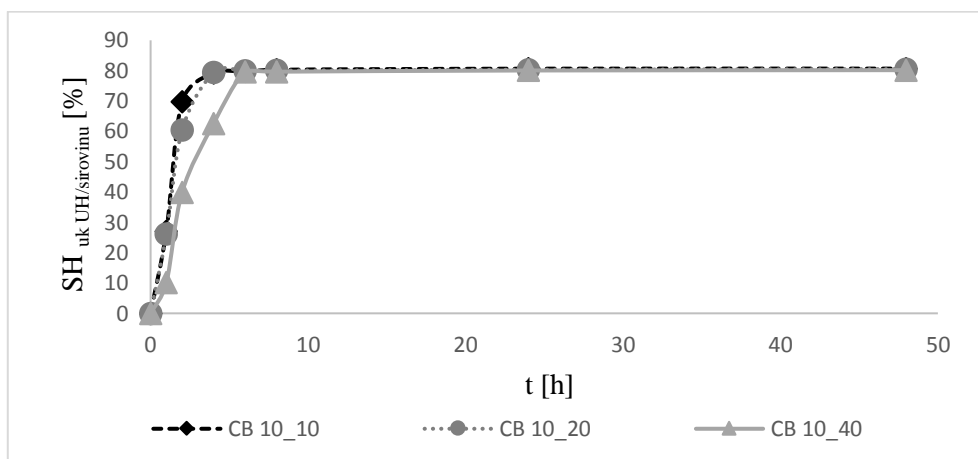
Slika 9b. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ksilana u ksilozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima $10 \text{ \% vol vol}^{-1}$. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Cellulase, enzyme blend.



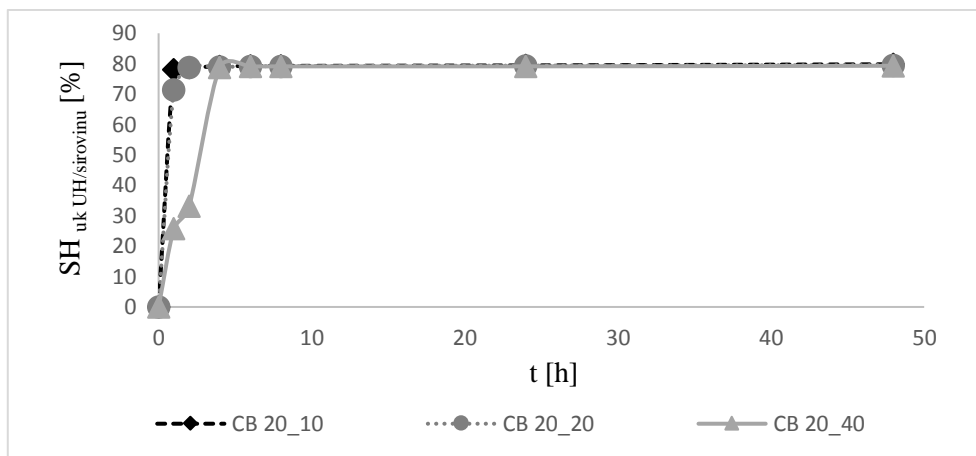
Slika 9c. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ksilana u ksilozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima $20 \text{ \% vol vol}^{-1}$. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Cellulase, enzyme blend.



Slika 10a. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ukupnih ugljikohidrata/sirovinu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Cellulase, enzyme blend.



Slika 10b. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ukupnih ugljikohidrata/sirovinu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $10 \text{ \% vol vol}^{-1}$. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8; enzim – Cellulase, enzyme blend.



Slika 10c. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ukupnih ugljikohidrata/sirovinu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od 20 % vol vol⁻¹. Uvjeti: 50 °C; pH 4,8; enzim – Cellulase, enzyme blend.

Hidrolizom 10 g L^{-1} kiseliniski predobrađenih kukuruznih oklasaka (PKO) pomoću 1 % vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blenda postignut je stupanj hidrolize glukana od 73,11 %, a povećanjem koncentracije oklasaka dovelo je do smanjenja hidrolize (slika 8a) na 47,87 % (20 g L^{-1} PKO) i 42,31 % (40 g L^{-1} PKO). Povećanjem koncentracije enzima (s 1 % vol vol⁻¹ na 10 % vol vol⁻¹ i 20 % vol vol⁻¹) postignuti su maksimalni mogući stupnjevi hidrolize glukana od 100 % kod svih testiranih koncentracija supstrata (slika 8b i 8c). Maksimalni stupanj hidrolize glukana postignut je unutar 6 h (10 % vol vol⁻¹ Cellulase i 40 g L^{-1} PKO), dok je povećanje koncentracije enzima na 20 % vol vol⁻¹ doprinijelo smanjenju vremena hidrolize glukana. Hidrolizom 10 g L^{-1} PKO potreban je 1 h, 20 g L^{-1} PKO 2 h te 40 g L^{-1} PKO 4 h za 100 %-tnu hidrolizu (slika 8c). Prema istraživanju enzimske hidrolize predobrađene rižine slame, brijestovine i borovine s Cellic CTec2 i Cellic HTec2 (20 FPU g⁻¹), hidroliza glukana je znatno sporija. Nakon 72 h enzimske hidrolize, Satari i sur. (2016) postigli su stupanj hidrolize glukana od 99 % (rižina slama), 99 % (brijestovina) i 84 % (borovina).

Stupnjevi hidrolize ksilana dobiveni su u rasponu od 27,21 % (1 % vol vol⁻¹ enzima i 40 g L^{-1} PKO; slika 9a) do 52,93 % (1 % vol vol⁻¹ enzima i 10 g L^{-1} PKO; slika 9a). Enzimskom hidrolizom 40 g L^{-1} supstrata s 10 % vol vol⁻¹ enzima ostvaren je stupanj hidrolize ksilana od 38,85 % (slika 9b), dok je povećanje koncentracije enzima na 20 % vol vol⁻¹ dovelo do smanjenja stupnja hidrolize za 10 % (slika 9c). Jednak trend smanjenja stupnja hidrolize ksilana primijećen je usporedbom preostalih testiranih koncentracija supstrata prilikom povećanja koncentracije enzima s 10 % na 20 %.

Usporedbom navedenih rezultata može se primijetiti da je hidroliza ksilana znatno sporija od hidrolize glukana s Cellulase, enzyme blend. Sav sadržaj glukana hidroliziran je s 20 % enzima unutar 1 h (10 g L^{-1} PKO; slika 8c), dok je u jednakim uvjetima 34,58 % hidrolize ksilana postignuto tek za 48 h (slika 9c).

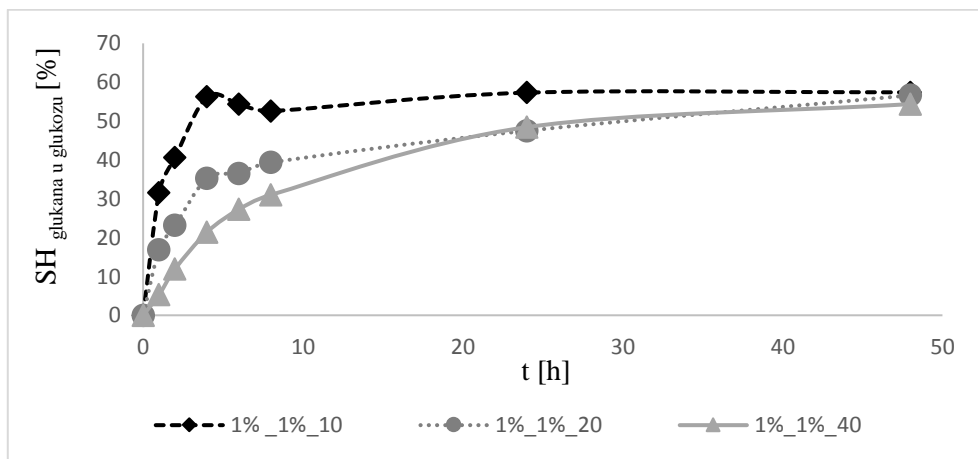
U eksperimentu kod kojeg je korišteno 1 % vol vol⁻¹ enzima u procesu s početnom koncentracijom supstrata 10 g L^{-1} PKO, stupanj enzimске hidrolize ukupnih ugljikohidrata bio je 60,59 %, dok se daljnjim povećanjem koncentracije supstrata na 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} PKO, stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata smanjio na 39,99 % i 34,79 % (slika 10a). Jednak trend smanjenja stupnja hidrolize dobili su Abedinifar i sur. (2009) prilikom hidrolize rižine slame pomoću celulaza i β -glukozidaze. Enzimskom hidrolizom 20 g L^{-1} predobrađene rižine slame postigli su stupanj hidrolize od 71,8 %, a povećanje koncentracije supstrata na 50 g L^{-1} i 100 g L^{-1} postigli su stupanj hidrolize od 62,0 % i 59,9 %.

Nadalje, u eksperimentu kad je korišteno 10 % vol vol⁻¹ enzima, kod svih ispitanih koncentracija supstrata, dobiven je stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata od 80 % (slika 10b), dok daljnje povećanje koncentracije enzima (s 10 na 20 % vol vol⁻¹) nije doprinijelo znatnijem povećanju stupnja hidrolize ukupnih ugljikohidrata (10 % enzima – SH \approx 80 %; 20 % enzima – SH \approx 79 %) u istom vremenskom intervalu (6 h). Također je dokazano da produljenje vremena enzimске hidrolize ne dovodi do značajne promjene u stupnju hidrolize ukupnih ugljikohidrata (6 h i 48 h). Pošto su Cellic CTec2 i Cellic HTec2 slična kombinacija enzima kao i Cellulase, enzyme blend, može se usporediti ukupni stupanj enzimске hidrolize predobrađene rižine slame primjenom navedenih enzima. Jednak stupanj hidrolize (79 %) ostvaren je unutar prva 3 h enzimskom hidrolizom rižine slame s 20 FPU g^{-1} (Satari i sur., 2016).

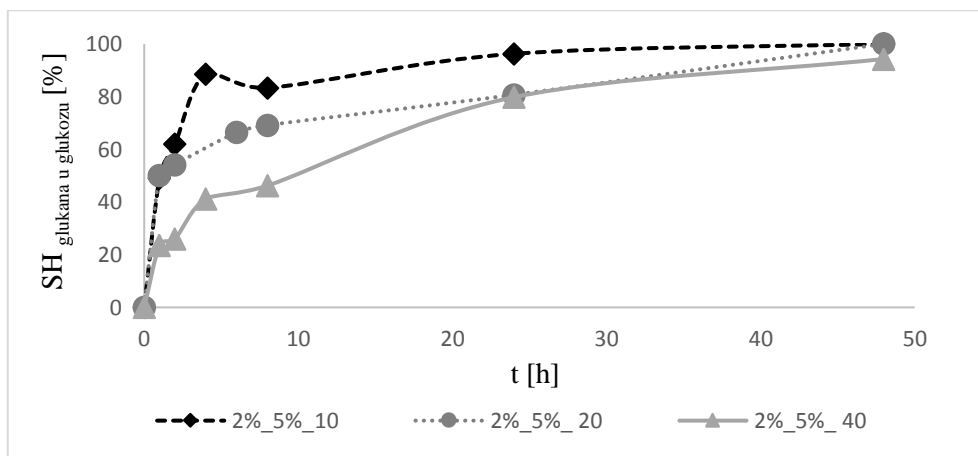
Na temelju navedenih rezultata stupnjeva hidrolize glukana postignutih pomoću Cellulase, enzyme blend vidljiv je znatno veći stupanj hidrolize u usporedbi s rezultatima dobivenih pomoću Viscozyme L. Razlog tome je, kao što je navedeno u prethodnom poglavlju 4.2.1., različita aktivnost celulaza i ksilanaza u komercijalnim enzimima. Također, stupnjevi hidrolize ksilana s Viscozyme L znatno su veći od hidrolize ksilana s Cellulase, enzyme blend. Usporedbom stupnjeva hidrolize ukupnih ugljikohidrata, veći stupnjevi hidrolize dobiveni su pomoću Cellulase, enzyme blend (od 34,79 % do 80,67 %) u usporedbi s Viscozyme L (od 13,89 % do 36,16 %).

4.2.3. Enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka s Cellulase, enzyme blend i Viscozyme L

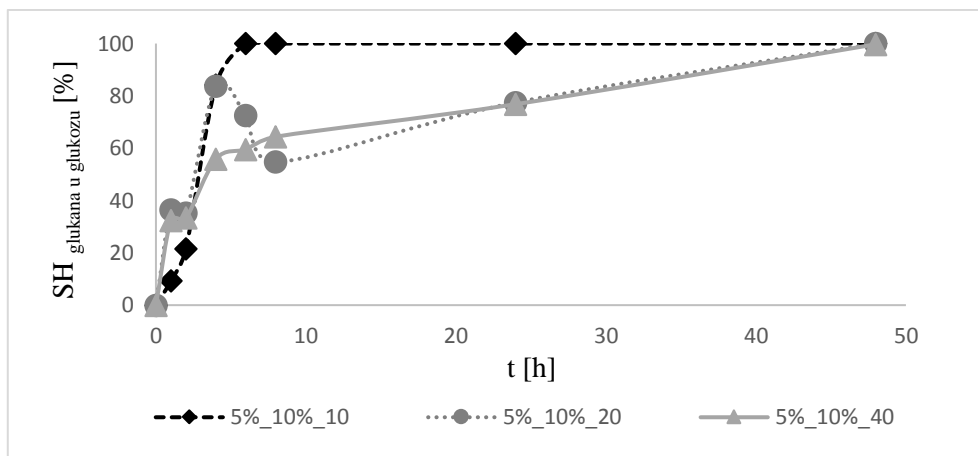
Nakon provedbe enzimske hidrolize sa zasebnim enzimima, provedena je enzimaska hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka pomoću mješavine Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend kako bi se odredilo može li se kombinacijom enzima postići bolji stupanj hidrolize u usporedbi sa zasebnim enzimima. Ispitan je efekt povećanja koncentracije enzima i supstrata na ukupnu enzimsku hidrolizu odabrane sirovine. Rezultati stupnjeva hidrolize prikazani su u ovisnosti o vremenu zasebno za hidrolizu glukana (slika 11a, 11b, 11c), ksilana (slika 12a, 12b, 12c) i za hidrolizu ukupnih ugljikohidrata/sirovinu (slika 13a, 13b, 13c).



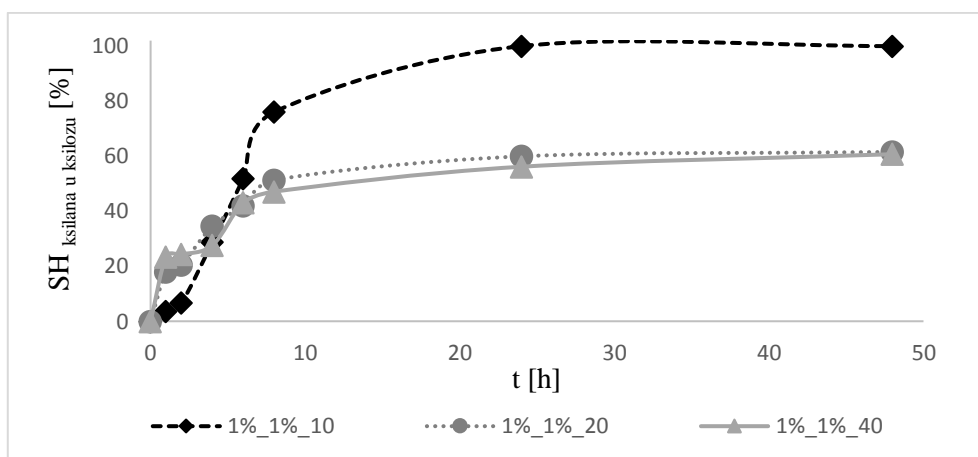
Slika 11a. Prikaz rezultata enzimske hidrolize glukana u glukozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, enzyme blend. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8.



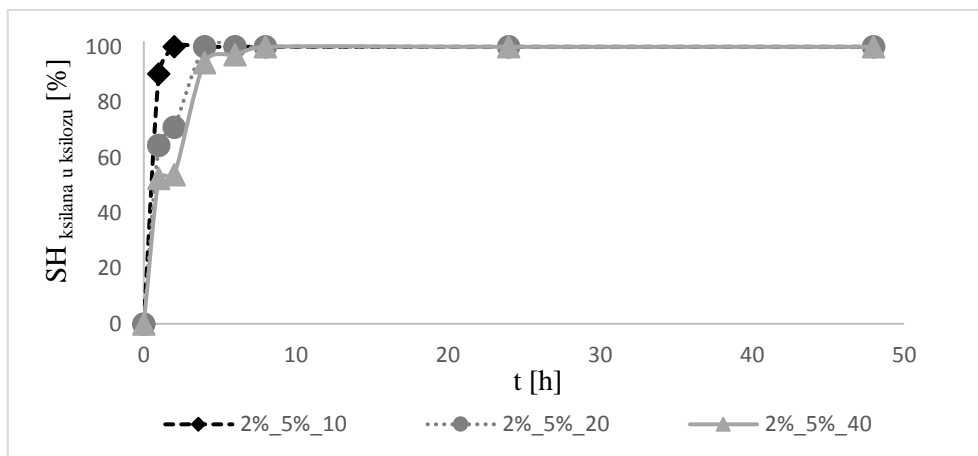
Slika 11b. Prikaz rezultata enzimske hidrolize glukana u glukozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $2 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $5 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, enzyme blend. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8.



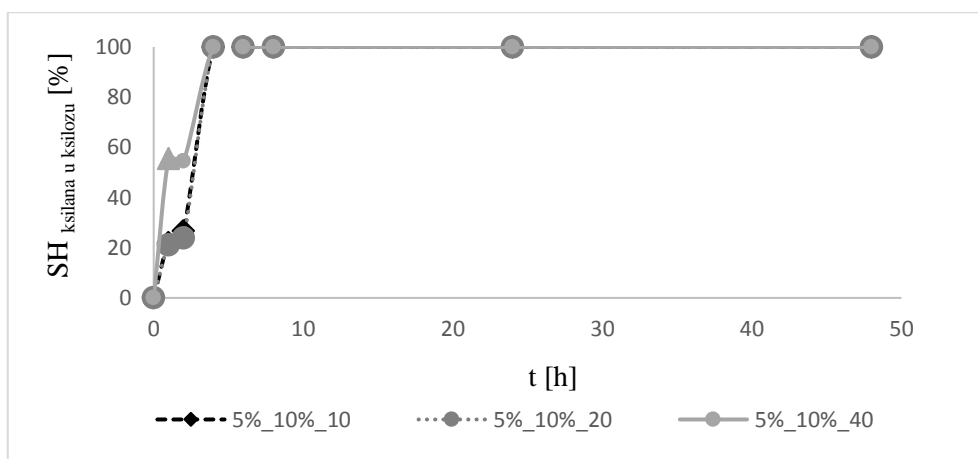
Slika 11c. Prikaz rezultata enzimske hidrolize glukana u glukozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $5 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $10 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, enzyme blend. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8.



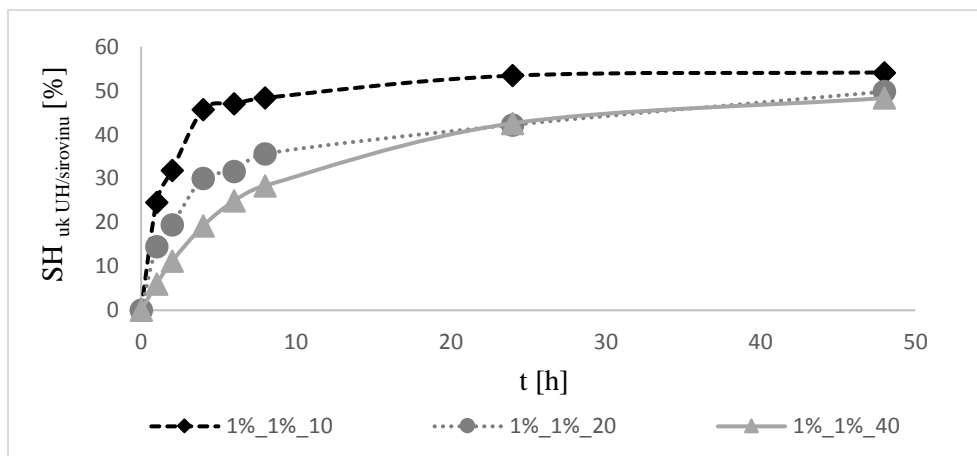
Slika 12a. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ksilana u ksilozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, enzyme blend. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8.



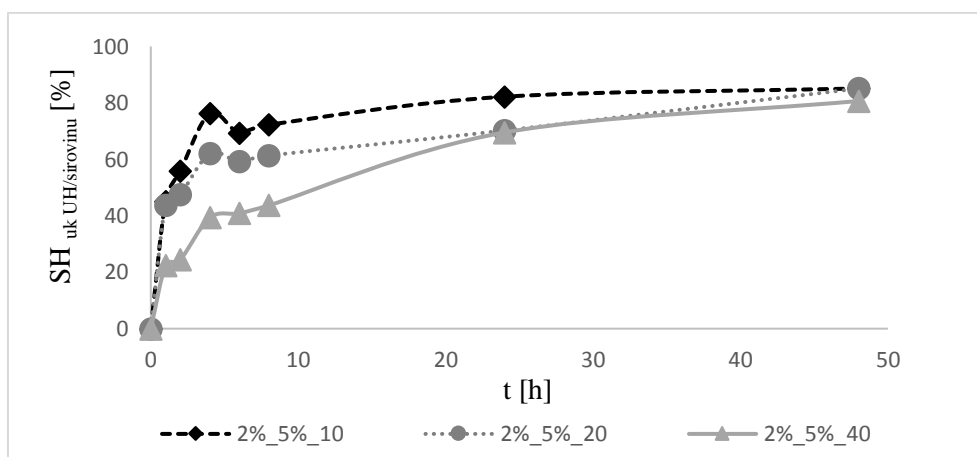
Slika 12b. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ksilana u ksilozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $2 \text{ \% vol vol}^{-1}$ ¹ Viscozyme L i $5 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, enzyme blend. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8.



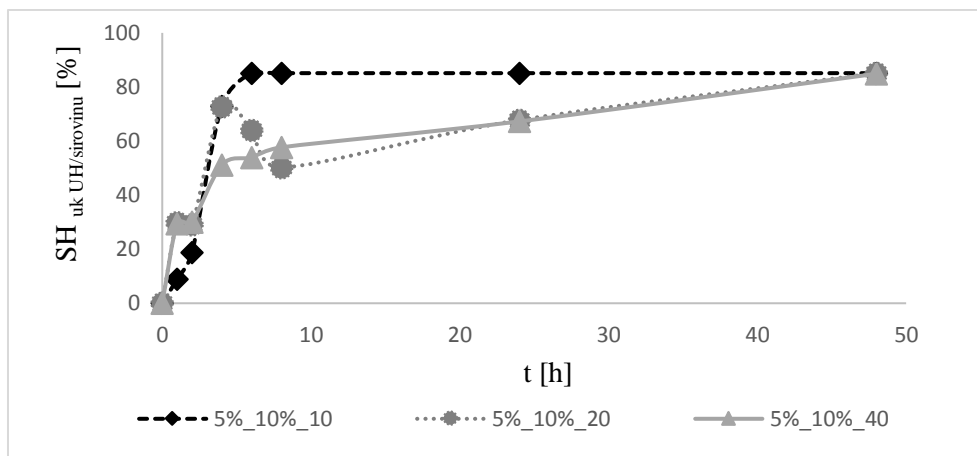
Slika 12c. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ksilana u ksilozu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $5 \text{ \% vol vol}^{-1}$ ¹ Viscozyme L i $10 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, enzyme blend. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8.



Slika 13a. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ukupnih ugljikohidrata/sirovinu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, enzyme blend. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8.



Slika 13b. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ukupnih ugljikohidrata/sirovinu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $2 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $5 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, enzyme blend. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8.



Slika 13c. Prikaz rezultata enzimske hidrolize ukupnih ugljikohidrata/sirovinu provedene s 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od $5 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $10 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, enzyme blend. Uvjeti: $50 \text{ }^\circ\text{C}$; pH 4,8.

Nakon provedenih hidroliza sa zasebnim enzimima, zaključeno je da testirani komercijalni enzimi postižu značajno različite stupnjeve hidrolize ukupnih ugljikohidrata. Kako bi se povećao stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata i time iskoristio sav potencijal sirovine, ali i kako bi se utvrdilo međudjelovanje enzima, provedena je enzimska hidroliza s tri različite kombinacije koncentracija enzima.

Provedbom enzimske hidrolize s $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, enzyme blend stupanj hidrolize glukana dobiven je u rasponu od $57,38 \text{ \%}$ hidrolizom 10 g L^{-1} PKO do $54,37 \text{ \%}$ hidrolizom 40 g L^{-1} PKO (slika 11a). Povećanjem koncentracije enzima na $2 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $5 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase te $5 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $10 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, tijekom hidrolize 10 g L^{-1} i 20 g L^{-1} supstrata, dovelo je do povećanja stupnja hidrolize glukana na 100 \% . Dok je u eksperimentu s $2 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $5 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, povećanje koncentracije kukuruznih oklasaka na 40 g L^{-1} , dovelo do smanjenja stupnja hidrolize glukana na $94,25 \text{ \%}$ (slika 11b). Daljnjim povećanjem koncentracije enzima na $5 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $10 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, postignuto je neznatno povećanje hidrolize glukana na $99,72 \text{ \%}$ (slika 11c). Razlog takvog rezultata može biti u nemogućnosti molekula enzima da prodru pri većim koncentracijama kroz supstrat, što dovodi do ograničenog prijenosa mase i smanjenja stupnja hidrolize (Althuri i Banerjee, 2017).

Enzimskom hidrolizom 20 g L^{-1} PKO s $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Viscozyme L i $1 \text{ \% vol vol}^{-1}$ Cellulase, enzyme blend postignut je stupanj hidrolize ksilana od $61,52 \text{ \%}$, a hidrolizom 40 g L^{-1} PKO $60,71 \text{ \%}$. Dok je smanjenje koncentracije kukuruznih oklasaka pri jednakoj koncentraciji

enzima povećalo stupanj hidrolize na 100 % (slika 12a). Na temelju rezultata prikazanih na slici 12b i 12c vidljivo je da su postignuti maksimalni stupnjevi hidrolize ksilana primjenom 2 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 5 % vol vol⁻¹ Cellulase u vremenu od 8 h, a povećanje koncentracije enzima na 5 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 10 % vol vol⁻¹ Cellulase dovelo je do skraćivanja vremena hidrolize na 4 h.

U eksperimentu u kojem je korišteno 1 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 1 % vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend (slika 13a) s koncentracijom 10 g L⁻¹ PKO, postignut je stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata od 54,11 %, dok je povećanje koncentracije PKO uzrokovalo smanjenje hidrolize na 49,76 % (20 g L⁻¹ PKO) i 48,30 % (40 g L⁻¹ PKO). Analizom rezultata stupnjeva hidrolize ukupnih ugljikohidrata postignutih s 2 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 5 % vol vol⁻¹ Cellulase te 5 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 10 % vol vol⁻¹ Cellulase dobivene su potpuno jednake vrijednosti hidrolize od 85,10 % pri koncentracijama kukuruznih oklasaka od 10 g L⁻¹ i 20 g L⁻¹ (slika 13b i 13c). Povećanjem koncentracije supstrata na 40 g L⁻¹ dovelo je do smanjenja stupnjeva hidrolize ukupnih ugljikohidrata na 80,67 % (2 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 5 % vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend) i 84,88 % (5 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 10 % vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend). Razlog tome je otežan prijenos mase te povećanje viskoznosti pri većim koncentracijama supstrata što otežava enzimima pristup supstratu (Althuri i Banerjee, 2017). Svi stupnjevi hidrolize ukupnih ugljikohidrata izraženi su na masu ukupne sirovine te se zbog toga ne može postići 100 %-tna hidroliza. Također, razlog može biti lignin koji sadrže predobrađeni kukuruzni oklasci jer lignin može smanjivati stupanj hidrolize zbog djelovanja na aktivnost celulaznih enzima i zbog ograničenja dostupnosti celuloze za enzimsku hidrolizu. Nadalje, razgradnjom lignina nastaju fenolni spojevi koji inaktiviraju celulolitičke enzime i time utječu negativno na hidrolizu jednako kao i topljivi i netopljivi lignin (Limayem i Ricke, 2012; Yang i sur., 2011).

Usporedbom rezultata provedenih enzimskih hidroliza s pojedinačnim enzimima i kombinacijom enzima mogu se primijetiti razlike u postignutim stupnjevima hidrolize. Primjenom kombinacije 1 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 1 % vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend za hidrolizu 20 g L⁻¹ i 40 g L⁻¹ PKO postignuti su za 10 % viši stupnjevi hidrolize glukana u usporedbi s 1 % vol vol⁻¹ čistog enzima Cellulase, enzyme blend. Provedbom hidrolize s 10 % vol vol⁻¹ čistog enzima Cellulase za potpunu hidrolizu glukana iz 20 g L⁻¹ PKO potrebno je 6 h, dok je dodatak 5 % vol vol⁻¹ Viscozyme L uzrokovao produljenje hidrolize na 48 h. Iz navedenog može se zaključiti da kada se koriste u kombinaciji, postoji određeno međudjelovanje enzima u usporedbi s hidrolizom pomoću pojedinačnih enzima.

Nakon hidrolize 40 g L⁻¹ PKO s 1 % vol vol⁻¹ Viscozyme L postignut je stupanj hidrolize ksilana od 39,93 %, a dodatkom 1 % vol vol⁻¹ Cellulase vidljivo je značajno povećanje stupnja hidrolize ksilana na 50,71 %. Također, za potpunu hidrolizu ksilana primjenom samo 10 % vol vol⁻¹ Viscozyme L (20 g L⁻¹ PKO) potrebno je 48 h, dok je smanjenjem koncentracije na 5 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i dodatkom 10 % vol vol⁻¹ Cellulase vrijeme hidrolize skraćeno na 4 h. Stoga, na temelju ovih rezultata može se zaključiti da postoji međudjelovanje enzima kada se primijeni kombinacija Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend. Vrijeme potrebno za hidrolizu ksilana skraćuje se primjenom dvije navedene komercijalne mješavine enzima, dok se hidroliza glukana produljuje.

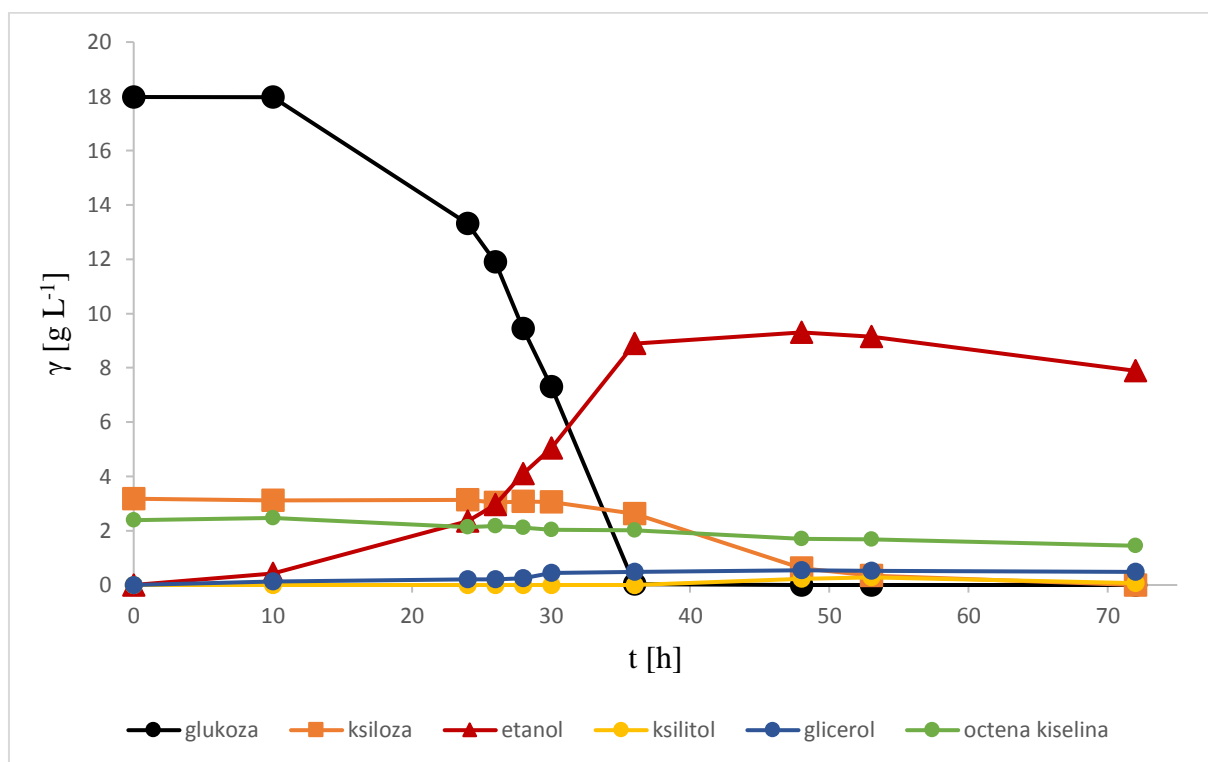
Analizom stupnjeva hidrolize ukupnih ugljikohidrata iz svih provedenih eksperimenata, najbolji rezultati dobiveni su primjenom kombinacija enzima od 2 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 5 % vol vol⁻¹ Cellulase te 5 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 10 % vol vol⁻¹ Cellulase. Pošto povećanje koncentracije oba enzima nije doprinijelo povećanju stupnja hidrolize ukupnih ugljikohidrata, važno je uzeti u obzir da troškovi procesa rastu utroškom veće koncentracije enzima. Do jednakog zaključka došli su i Althuri i Banerjee (2017) koji su proveli enzimsku hidrolizu mješavine lignoceluloznih sirovina te su naveli da prevelika koncentracija enzima samo drastično povećava troškove procesa, a ne mora povećati njegovu efikasnost.

4.3. UZGOJ PLIJESNI *Mucor indicus* I PROIZVODNJA ETANOLA NA HIDROLIZATU PREDOBRAĐENIH KUKURUZHNIH OKLASAKA

Nakon provedenih enzimskih hidroliza određena je najučinkovitija kombinacija komercijalnih enzima za enzimsku hidrolizu predobrađenih kukuruznih oklasaka. Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.10. pripremljen je hidrolizat s 40 g L⁻¹ predobrađenih kukuruznih oklasaka i koncentracijom enzima od 5 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 2 % vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend. Supernatant dobivenog hidrolizata korišten je za uzgoj plijesni *Mucor indicus* i proizvodnju etanola u dva reaktorska sustava, HRCB-u i barbotirajućem bioreaktoru. Barbotirajući bioreaktor je zapravo prenamijenjen reaktor s miješalom koji je modificiran kako bi se umanjili najčešći nedostaci takvog reaktora, velika potrošnja energije i oštećenje stanica uslijed miješanja (Šantek i sur., 2006). Inokulum plijesni pripremljen je 24 h prije samog uzgoja u reaktoru. Za proizvodnju etanola na hidrolizatu kukuruznih oklasaka odabrana je plijesan *M. indicus* jer može koristiti glukozu i ksilozu koji su osnovni šećeri prisutni u korištenom hidrolizatu, dok najčešće korišteni kvasac *S. cerevisiae* ne može iskorištavati ksilozu. Također, odabrana plijesan može podnositi i iskorištavati prisutne inhibitore iz hidrolizata lignoceluloznih sirovina, poput furfurala, hidroksimetil furfurala i octene kiseline (Karimi i sur., 2008; Millati i sur., 2008). Još jedna prednost odabrane plijesni je što biomasa sadrži hitozan, lipide, glukozamin i dr. Hitozan ima brojne primjene u poljoprivredi, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao što su konzerviranje hrane i voćnih sokova, pročišćavanje vode, ubrzavanje zacjeljivanja rana i dr. (Karimi i sur., 2006). Tijekom oba uzgoja praćena je koncentracija glukoze, ksiloze, etanola, ksilitola, octene kiseline i glicerola. Također, zbog specifičnosti dimorfizma plijesni, tijekom uzgoja praćen je rast i oblik plijesni mikroskopiranjem.

4.3.1. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* i proizvodnja etanola na hidrolizatu predobrađenih kukuruznih oklasaka u HRCB-u

Uzgoj plijesni *Mucor indicus* proveden je kako bi se ispitalo može li se na hidrolizatu predobrađenih kukuruznih oklasaka postići efikasna proizvodnja etanola u HRCB-u. Također, uzgoj je proveden kako bi se odredilo u kojem se bioreaktorskom sustavu postiže bolja proizvodnja etanola s obzirom na različite uvjete aeracije, miješanja i regulacije temperature. Rezultati su prikazani na slici 14 kao koncentracije šećera i etanola [g L^{-1}] u ovisnosti o vremenu uzgoja te je na slici 15 prikazana promjena u morfologiji plijesni tijekom uzgoja.

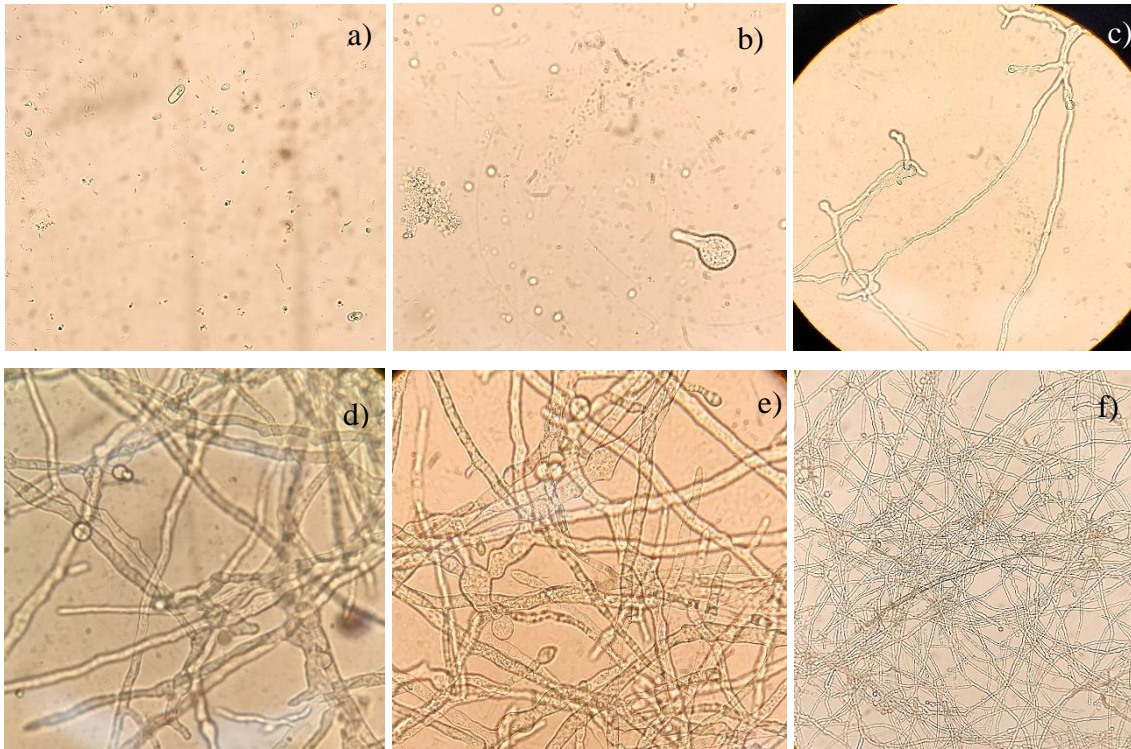


Slika 14. Prikaz promjene koncentracije glukoze, ksiloze, etanola, ksilitola, glicerola i octene kiseline tijekom uzgoja plijesni *Mucor indicus* u HRCB-u na hidrolizatu kukuruznih oklasaka. Uvjeti: broj okretaja u HRCB 20 min^{-1} ; vrijeme uzgoja 72 h, ukupni volumen 4 L.

Hidrolizat kukuruznih oklasaka korišten za proizvodnju etanola na početku je sadržavao $17,98 \text{ g L}^{-1}$ glukoze i $3,18 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze. U prvih 30 h plijesan je za rast i proizvodnju etanola koristila isključivo glukozu iako je u podlozi bila prisutna i ksiloza. Nakon utroška glukoze započinje trošenje ksiloze, a početak prilagodbe može se uočiti na slici 14. Takav način rasta naziva se diauksični rast koji je karakterističan za *M. indicus*. Nakon 48 h iz prisutnih šećera nastala je maksimalna koncentracija etanola od $9,30 \text{ g L}^{-1}$, a na kraju cijele proizvodnje u HRCB-u, koja je trajala 72 h, koeficijent konverzije supstrata u produkt ($Y_{\text{etanola/S}}$) iznosi 0,37 g

g^{-1} uz efikasnost cijelog procesa od 72,55 %. Produktivnost proizvodnje etanola iznosila je $0,11 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ uz postignutu maksimalnu brzinu od $0,11 \text{ h}^{-1}$. Za usporedbu, sličan koeficijent konverzije supstrata u produkt od $0,39 \text{ g g}^{-1}$ dobili su Abedinifar i sur. (2009) tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* u anaerobnim uvjetima na hidrolizatu 20 g L^{-1} rižine slame. Tijekom uzgoja u HRCB-u vladali su mikroaerofilni uvjeti, zbog toga je bolja usporedba uzgoj plijesni na hidrolizatu drva uz aeraciju od $0,1 \text{ L min}^{-1}$ pri čemu je postignut jednak $Y_{\text{etanol/S}}$ od $0,37 \text{ g g}^{-1}$ (Millati i sur., 2008). Također, uzgojem kvasca *S. cerevisiae* na mješavini šećera postignut je $Y_{\text{etanol/S}}$ od $0,32 \text{ g g}^{-1}$ uz maksimalnu brzinu proizvodnje etanola od $0,37 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Hamidimotlagh i sur., 2007). Između 48 h i 72 h uzgoja zamijećen je pad koncentracije etanola s $9,30 \text{ g L}^{-1}$ na $7,89 \text{ g L}^{-1}$. Razlog tome je što plijesan može koristiti etanol kao izvor ugljika kada se u podlozi iscrpe šećeri. Također, nakon 48 h uzgoja zamijećena je proizvodnja ksilitola koji nastaje kao međuprodukt razgradnje ksiloze čiji je $Y_{\text{ksilitol/S}}$ na kraju uzgoja iznosio $0,099 \text{ g g}^{-1}$. Za usporedbu, tijekom uzgoja na hidrolizatu drva Millati i sur. (2008) postigli su $Y_{\text{ksilitol/S}}$ od $0,036 \text{ g g}^{-1}$. Također, na kraju uzgoja zamijećena je proizvodnja glicerola koji je nusprodukt proizvodnje u koncentraciji od $0,49 \text{ g L}^{-1}$.

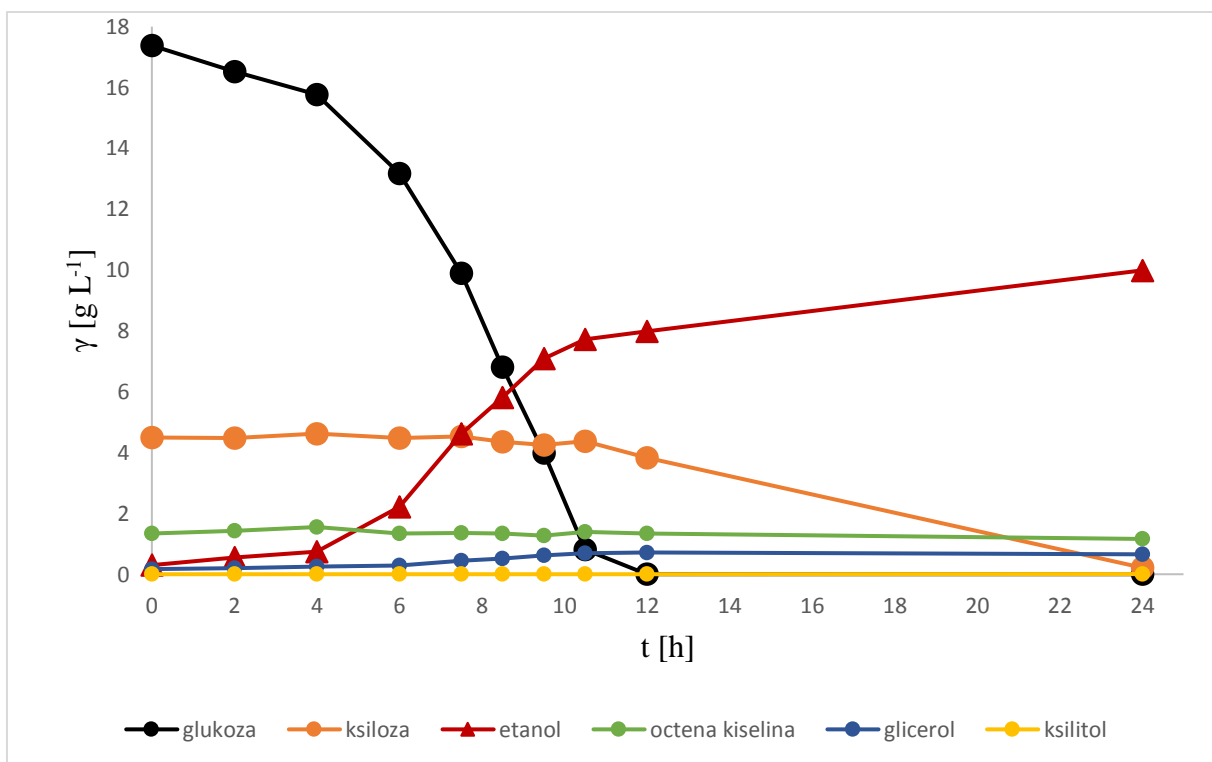
Na slici 15 vidljivo je da u početku uzgoja plijesan raste u obliku individualnih stanica sličnih kvascu, a nakon 24 h započinje filamentozni rast. Prema literaturi, faktori koji utječu na dimorfizam plijesni *M. indicus* su koncentracija šećera, posebno glukoze i uvjeti kultivacije. Pri nižim koncentracijama glukoze plijesan raste u filamentoznom obliku, a kada je koncentracija glukoze dovoljno visoka, dolazi do represije filamentoznog rasta te započinje rast u obliku kvasca (Karimi i Zamani, 2013). Iz navedenog i dobivenih rezultata može se zaključiti da nakon 28 h kada je koncentracija glukoze pala ispod 10 g L^{-1} započinje filamentozan rast plijesni. Također, na rast plijesni mogu utjecati i inhibitori poput furana i octene kiseline koji nastaju tijekom hidrolize kukuruznih oklasaka (Karimi i Zamani, 2013; Millati i sur., 2008). Zbog visokog koeficijenta konverzije supstrata u produkt može se zaključiti da koncentracija furana od $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ (poglavlje 3.3.7.; tablica 3) i octene kiseline između $1,44 \text{ g L}^{-1}$ i $2,47 \text{ g L}^{-1}$ nema negativan utjecaj, što potvrđuje i istraživanje Lennartsson i sur. (2009) gdje je proveden uspješan uzgoj na hidrolizatu drva s $6,93 \text{ g L}^{-1}$ octene kiseline, $0,51 \text{ g L}^{-1}$ furfurala i $1,12 \text{ g L}^{-1}$ hidroksimetil furfurala. Furfural je u različitim ispitanim uvjetima u potpunosti asimiliran, kao i octena kiselina prisutna u sirovini, dok se utjecaj octene kiseline primjećuje tek kada se doda kao izvor ugljika (Lennartsson i sur., 2009).



Slika 15. Mikroskopska slika plijesni *Mucor indicus* tijekom uzgoja u HRCB-u nakon:
a) 2 h; b) 6 h; c) 24 h; d) 52 h; e) 72 h (povećanje 400x); f) 72 h (povećanje 100x).

4.3.2. Uzgoj plijesni *Mucor indicus* i proizvodnja etanola na hidrolizatu kukuruznih oklasaka u barbotirajućem bioreaktoru

Uzgoj plijesni *Mucor indicus* proveden je kako bi se ispitalo može li se na hidrolizatu predobrađenih kukuruznih oklasaka postići efikasna proizvodnja etanola u barbotirajućem bioreaktoru. Također, uzgoj je proveden kako bi se odredilo u kojem se bioreaktorskom sustavu postiže bolja proizvodnja etanola s obzirom na različite uvjete aeracije, miješanja i regulacije temperature. Rezultati su prikazani na slici 16 kao koncentracije šećera i etanola [g L^{-1}] u ovisnosti o vremenu uzgoja te je na slici 17 prikazana promjena u morfologiji plijesni tijekom uzgoja.



Slika 16. Promjena koncentracije glukoze, ksiloze, etanola, glicerola i octene kiseline tijekom uzgoja plijesni *Mucor indicus* u barbotirajućem bioreaktoru na hidrolizatu kukuruznih oklasaka. Uvjeti: aeracija $0,5 \text{ L min}^{-1}$, $28 \text{ }^\circ\text{C}$, vrijeme uzgoja 24h, volumen 1,3 L.

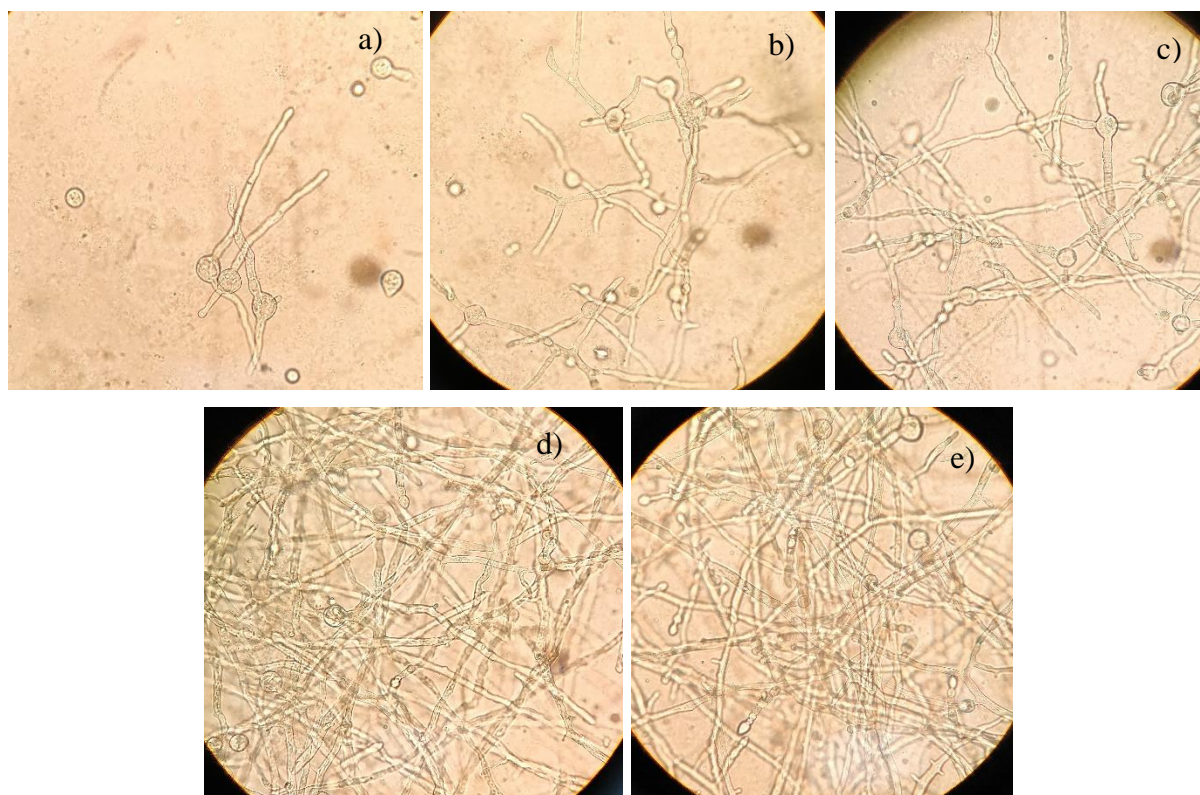
Proizvodnja etanola u barbotirajućem bioreaktoru započela je s $17,38 \text{ g L}^{-1}$ glukoze i $4,49 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze uz stalnu aeraciju od $0,5 \text{ L min}^{-1}$. Prvu polovicu uzgoja, glavni izvor ugljika bila je glukoza te je nakon 10,5 h uočen prijelaz potrošnje glukoze na ksilozu što je vidljivo na slici 16, dok je u HRCB-u za prijelaz na drugi izvor ugljika bilo potrebno 30 h. Razlog takve razlike u vremenu potrošnje jednake koncentracije glukoze je u različitim primijenjenim uvjetima, tj. različitoj aeraciji i regulaciji temperature. Za potrošnju svih šećera u barbotirajućem bioreaktoru

potrebno je 24 h pri čemu je postignut koeficijent pretvorbe supstrata u etanol od $0,46 \text{ g g}^{-1}$ ($Y_{\text{etanol/S}}$). Ako se usporedi dobiveni rezultat s maksimalnim teoretskim koeficijentom pretvorbe supstrata u produkt od $0,51 \text{ g g}^{-1}$, efikasnost procesa iznosi 90,20 %. Dok je produktivnost nastanka etanola iznosila $0,40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ uz maksimalnu brzinu proizvodnje od $0,21 \text{ h}^{-1}$ između sedmog i desetog sata. Približan rezultat od $0,43 \text{ g g}^{-1}$ ($Y_{\text{etanol/S}}$) postigli su Lennartson i sur. (2009) prilikom aerobne proizvodnje etanola pomoću *M. indicus* u bioreaktoru s miješalom na hidrolizatu drva. Za usporedbu dobivenih rezultata, Hamidimotlagh i sur. (2007) postigli su kofermentacijom pomoću *P. stipitis* i *S. cerevisiae* na mješavini šećera $Y_{\text{etanol/S}}$ od $0,41 \text{ g g}^{-1}$ uz maksimalnu brzinu proizvodnje etanola od $0,32 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ i produktivnost od $0,77 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Prema literaturi, povećanjem aeracije ne dolazi do proizvodnje ksilitola iz ksiloze i oslobađanja iz stanice, nego se ksiloza konvertira u ksilulozu i konvertira u etanol (Millati i sur., 2008). Zbog izrazito aerobnih uvjeta u barbotirajućem bioreaktoru, nije došlo do proizvodnje ksilitola. Tijekom proizvodnje etanola zamijećen je porast glicerola od $0,17 \text{ g L}^{-1}$ na $0,66 \text{ g L}^{-1}$. Proizvodnja etanola u barbotirajućem bioreaktoru završena je s $9,99 \text{ g L}^{-1}$ etanola i $12,02 \text{ g L}^{-1}$ biomase, a u HRCB-u s $7,89 \text{ g L}^{-1}$ i $3,95 \text{ g L}^{-1}$ biomase. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da aeracija značajno utječe na proizvodnju biomase što su potvrdili Lennartson i sur. (2009) i Sues i sur. (2005) usporedbom aerobnog i anaerobnog uzgoja u bioreaktoru s miješalom. Plijesan *M. indicus* u aerobnim uvjetima raste puno brže što se može i primijetiti usporedbom slike 15 i slike 17. Vidljivo je da uzgojem u barbotirajućem bioreaktoru u aerobnim uvjetima započet filamentozni rast već tijekom prvih 6 h, dok je u HRCB-u, u mikroaerofilnim uvjetima, bilo potrebno više od 24 h. Pregledom literature, plijesan u anaerobnim uvjetima proizvodi više etanola u usporedbi s procesom u aerobnim uvjetima, prema tome, očekivano je da će plijesan u HRCB-u postići veći koeficijent konverzije supstrata u etanol u usporedbi s barbotirajućim bioreaktorom. Rezultati provedenih uzgoja prikazani u tablici 6 pokazuju drugačiji odnos, a razlog može biti što u HRCB-u nije bilo održavanja optimalnih uvjeta temperature, te je uzgoj proveden u mikroaerofilnim uvjetima.

Tijekom proizvodnje etanola u barbotirajućem bioreaktoru koncentracija octene kiseline bila je nešto niža (maksimalna vrijednost $1,55 \text{ g L}^{-1}$) u usporedbi s HRCB-om što je dodatno moglo povoljno utjecati na konačnu konverziju jer octena kiselina može djelovati kao inhibitor proizvodnje etanola. Prema dostupnoj literaturi odabrana plijesan može koristiti ksilozu za proizvodnju etanola u aerobnim i mikroaerofilnim uvjetima. Prema istraživanju Millati i sur. (2008), *M. indicus* iskorištava brže ksilozu povećanjem aeracije, za utrošak 10 g L^{-1} ksiloze pri aeraciji od $0,1 \text{ L min}^{-1}$ potrebno je 65,5 h, dok povećanjem aeracije na $0,5 \text{ L min}^{-1}$ potrebno je 45,7 h. Takvo smanjenje vremena potrošnje ksiloze potvrđeno je uzgojem u HRCB-u i

barbotirajućem bioreaktoru. Za utrošak $4,49 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze u aerobnim uvjetima potrebno je 24 h, a u mikroaerofilnim uvjetima potrošnja $3,18 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze je produžena na 72 h. Prema dobivenim rezultatima proizvodnje etanola u oba ispitana reaktorska sustava (tablica 6) i prema Sues i sur. (2005), proizvodnja etanola pomoću plijesni *M. indicus* konkurentna je proizvodnji pomoću *S. cerevisiae* na glukozi ($Y_{P/S} = 0,42 \text{ g g}^{-1}$).



Slika 17. Mikroskopska slika plijesni *Mucor indicus* tijekom uzgoja u barbotirajućem bioreaktoru nakon: a) 0 h; b) 4 h; c) 6 h; d) 9,5 h; e) 24 h (povećanje 400x).

Tablica 6. Prikaz parametara uspješnosti proizvodnje etanola u HRCB-u i barbotirajućem bioreaktoru.

| | HRCB | Barbotirajući bioreaktor |
|--------------------------------------|-------|--------------------------|
| $Y_{etanol/S} [\text{g g}^{-1}]$ | 0,37 | 0,46 |
| $r_P [\text{h}^{-1}]$ | 0,11 | 0,21 |
| $Pr [\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}]$ | 0,11 | 0,40 |
| E [%] | 72,55 | 90,20 |

5. ZAKLJUČCI

1. Iz rezultata enzimskih hidroliza predobrađenih kukuruznih oklasaka pri temperaturi od 50 °C i pH 4,8 pomoću Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend može se zaključiti da Viscozyme L ima veći utjecaj na hidrolizu ksilana, a Cellulase, enzyme blend na hidrolizu glukana. Provedbom enzimске hidrolize s koncentracijama enzima od 1 % vol vol⁻¹ povećanje koncentracije supstrata od 10 g L⁻¹ do 40 g L⁻¹ značajno utječe na smanjenje stupnja hidrolize ukupnih ugljikohidrata. Dok već samom primjenom 10 % vol vol⁻¹ enzima, koncentracija supstrata nema značajan utjecaj na stupanj hidrolize.
2. Na temelju provedenih eksperimenata najbolji stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata od 85,10 % dobiven je pomoću kombinacije enzima 2 % vol vol⁻¹ Viscozyme L i 5 % vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend, dok su najniži rezultati stupnja hidrolize dobiveni primjenom Viscozyme L. Povećanjem koncentracije enzima iznad navedenih vrijednosti nije doprinijelo povećanju stupnja hidrolize ukupnih ugljikohidrata, ni značajnom smanjenju vremena hidrolize kod svih ispitanih koncentracija supstrata.
3. U industrijskoj proizvodnji sve je veće zanimanje za plijesan *Mucor indicus* za proizvodnju bioetanolu iz različitih lignoceluloznih sirovina. Najveća prednost plijesni je što može iskoristiti glavne sastojke lignoceluloze, glukozu i ksilozu s visokim prinosima etanola, u aerobnim i anaerobnim uvjetima, može podnositi i iskorištavati inhibitorne sastojke prisutne u lignoceluloznim hidrolizatima. Najveća mana plijesni je njezin filamentozni rast koji otežava vođenje procesa pogotovo povećanjem mjerila na industrijsku razinu.
4. Proizvodnja etanola pomoću *M. indicus* provedena je na hidrolizatu kukuruznih oklasaka u HRCB-u (volumen 4L) te je koeficijent konverzije supstrata u etanol iznosio 0,37 g g⁻¹ uz produktivnost proizvodnje etanola od 0,11 g L⁻¹ h⁻¹ što daje efikasnost procesa od 72,55 %. Maksimalna postignuta brzina proizvodnje etanola iznosi 0,11 h⁻¹, a tijekom procesa vođenog u mikroaerofilnim uvjetima proizvedeno je 3,95 g L⁻¹ biomase.
5. Koeficijent konverzije supstrata u etanol u barbotirajućem bioreaktoru (volumen 1,3 L) iznosio je 0,46 g g⁻¹. Zbog održavanja aerobnih uvjeta (0,5 L min⁻¹) i temperature od 28 °C proizvedeno je 12,02 g L⁻¹ biomase, a efikasnost takvog procesa iznosi 90,20 %.

Produktivnost proizvodnje etanola iznosila je $0,40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a maksimalna brzina proizvodnje etanola iznosi $0,21 \text{ h}^{-1}$.

6. Na temelju rezultata proizvodnje etanola u dva reaktorska sustava može se zaključiti da se uz bolju regulaciju procesa i smanjenjem volumena može postići veći prinos etanola. Uzimajući u obzir troškove procesa koji se odnose na količinu utrošenog enzima i energije te s obzirom da je veća efikasnost procesa postignuta u barbotirajućem bioreaktoru može se zaključiti da je barbotirajući bioreaktor bolji sustav proizvodnje etanola u ispitanim uvjetima.

6. LITERATURA

Abedinifar, S., Karimi, K., Khanahmadic, M., Taherzadeh, M. J. (2009) Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. *Biomass Bioenerg.* **33**, 828-833. doi:10.1016/j.biombioe.2009.01.003.

Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., Sebayang, A. H. (2016) Second generation bioethanol production. A critical review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **66**, 631-653. doi: 10.1016/j.rser.2016.07.015.

Adney, B., Baker, J. (2008) Measurement of Cellulase Activities, National Renewable Energy Laboratory. Technical Report NREL/TP-510-42628.

Alonso, D. M., Wettstein, S. G., Dumesic, J. A. (2012) Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 8075–8098. doi:10.1039/c2cs35188a.

Althuri, A., Banerjee, R. (2017) Separate and simultaneous saccharification and fermentation of a pretreated mixture of lignocellulosic biomass for ethanol production, *Biofuels.* **10**, 61-72. doi: 10.1080/17597269.2017.1409059.

Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., Šantek, B. (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng. Life Sci.* **18**, 768–778. doi: 10.1002/elsc.201800039.

Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energ. Convers. Manage.* **52**, 858-875. doi: 10.1016/j.enconman.2010.08.013.

Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technol. Biotech.* **56**, 289-311. doi:10.17113/ftb.56.03.18.5546.

Goswami, G. K., Rawat, S. (2015) Microbial Xylanase and their applications - A review. *Int. J. Curr. Res. Acad. Rev.* **3**, 436-450. doi: 10.5455/2319-2003.ijbcp20130602.

Hamidimotlagh, R., Nahvi, I., Emtiazi, G., Abedinifar, S. (2007) Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Sacharomyces cerevisiaea*, and an isolated xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cocultures. *Afr. J. Biotechnol.* **6**, 1110-1114. doi: 10.5897/AJB2007.000-2144.

Karimi, K., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2008) *Mucor indicus* as a biofilter and fermenting organism in continuous ethanol production from lignocellulosic hydrolysate. *Biochem. Eng. J.* **39**, 383-388. doi: 10.1016/j.bej.2007.10.009.

Karimi, K., Zamani, A. (2013) *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. *Biotechnol. Adv.* **31**, 466-481. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.009.

Kucharska, K., Rybarczyk, P., Hołowacz, I., Łukajtis, R., Glinka, M., Kamiński, M. (2018) Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules.* **23**, 2937. doi: 10.3390/molecules23112937.

Kuhad, R. C., Gupta, R., Singh, A. (2011) Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Res.* **2011**, 1-10. doi: 10.4061/2011/280696.

Limayem, A., Ricke, S. C. (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energ. Combust.* **38**, 449-469. doi:10.1016/j.pecs.2012.03.002.

Lennartsson, P., Karimi, K., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2009) Effects of different growth forms of *Mucor indicus* on cultivation on dilute-acid lignocellulosic hydrolyzate, inhibitor tolerance, and cell wall composition. *J. Biotechnol.* **143**, 255-261. doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.07.011.

Mardetko, 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*. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **32**, 483–499. doi: 10.15255/CABEQ.2018.1409.

Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2005) Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. *Enzyme Microb. Tech.* **36**, 294–300. doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.09.007.

Millati, R., Karimi, K., Edebo, L., Niklasson, C., Taherzadeh, M. J. (2008). Ethanol production from xylose and wood hydrolyzate by *Mucor indicus* at different aeration rates. *BioResources.* **3**, 1020-1029. doi: 10.15376/biores.3.4.1020-1029.

Pinaki, D., Lhakpa, W., Joginder, S. (2015) Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF), An Efficient Process for Bio-Ethanol Production: An overview. *Biosci. Biotech. Res. Asia.* **12**, 87-100. doi: 10.13005/bbra/1639.

Rodrigues, A. C., Haven, M. Ø., Lindedam, J., Felby, C., Gama, M. (2015) Celluclast and Cellic® CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid-liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. *Enzyme Microb. Tech.* **79**, 70-77. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.06.019.

Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., Wu, Y. V. (2005) Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochem.* **40**, 3693-3700. doi: 10.1016/j.procbio.2005.04.006.

Sahare, P., Singh, R., Laxman, S., Rao, M. (2012) Effect of Alkali Pretreatment on the Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Corn Cob. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **168**, 1806-1819. doi: 10.1007/s12010-012-9898-y.

Satari, B., Karimi, K., Zamani, A. (2016) Oil, chitosan, and ethanol production by dimorphic fungus *Mucor indicus* from different lignocelluloses. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **91**, 1835-1843. doi: 10.1002/jctb.4776.

Selim, K. A., El-Ghwas, D. E., Easa, S., M., Hassan, M. I. A. (2018) Bioethanol a Microbial Biofuel Metabolite; New Insights of Yeasts Metabolite Engineering. *Ferment.* **4**, 1-27. doi: 10.3390/fermentation4010016.

Sharifyazd, S., Karimi, K. (2017) Effects of fermentation conditions on valuable products of ethanolic fungus *Mucor indicus*. *Electron. J. Biotechn.* **30**, 77-82. doi: 10.1016/j.ejbt.2017.09.003.

Sharma, N., Sharma, N. (2018) Microbial xylanases and their industrial applications as well as future perspectives: a review. *G.J.B.A.H.S.* **6**, 5-12. doi:10.24105/gjbahs.6.3.1702.

Sues, A., Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2005) Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolysate by *Mucor indicus*. *Fems. Yeast. Res.* **5**, 669-676. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.10.013.

Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Bioresource Technol.* **83**, 1-11. doi:10.1016/S0960-8524(01)00212-7.

Šantek, B., Ivančić, M., Horvat, P., Novak, S., Marić, V. (2006) Horizontal Tubular Bioreactors in Biotechnology. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **20**, 389-399.

Verardi, A., De Bari, I., Ricca, E., Calabrň, V. (2012) Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. U: Bioethanol, (Pinheiro Lima, M. A., ured.), In Tech, Rijeka, str. 95-122.

Yang, B., Dai, Z., Ding, S. Y., Wyman, C. E. (2011) Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels.* **2**, 421-450. doi: 10.4155/bfs.11.116.

7. PRILOZI

7.1. Baždarni pravci za određivanje koncentracije ugljikohidrata i proizvoda tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Tablica 7. Retencijska vremena i baždarni pravci (HPLC).

| spoj | t_R [min] | jednadžba baždarnog pravca | R^2 [-] |
|-----------------|-------------|--|-----------|
| glukoza | 13,021 | $A = 377242,19 \gamma(\text{glukoza}) - 4487,06$ | 1,00 |
| ksiloza | 13,813 | $A = 362057,09 \gamma(\text{ksiloza}) + 5598,61$ | 1,00 |
| etanol | 27,464 | $A = 1163351,70 \gamma(\text{etanol}) - 953,28$ | 1,00 |
| ksilitol | 15,760 | $A = 362963,41 \gamma(\text{ksilitol}) + 9251,37$ | 1,00 |
| octena kiselina | 19,936 | $A = 164952,59 \gamma(\text{octena kiselina}) + 2260,96$ | 1,00 |
| glicerol | 18,183 | $A = 298199,58 \gamma(\text{glicerol}) + 7203,54$ | 1,00 |
| celobioza | 10,760 | $A = 378874,5985 \gamma(\text{celobioza}) - 797,7069$ | 1,00 |

7.2. Baždarni pravci za određivanje koncentracije ugljikohidrata tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Tablica 8. Retencijska vremena i baždarni pravci (UPLC).

| spoj | t_R [min] | jednadžba baždarnog pravca | R^2 [-] |
|-----------|-------------|--|-----------|
| glukoza | 5,06 | $A = 83241 \gamma(\text{glukoza}) + 11510$ | 0,9986 |
| ksiloza | 3,75 | $A = 66325 \gamma(\text{ksiloza}) + 9629,3$ | 0,9997 |
| celobioza | 7,98 | $A = 73880 \gamma(\text{celobioza}) + 10635$ | 0,9998 |

IZJAVA O IZVORNOSTI

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



Valentina Fičko