

Usporedba procesa kiselinske i alkalne predobrade otpadne trave u vilotlačnom reaktoru

Vrdoljak, Josipa

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:159:228107>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 19. rujna 2019.

Josipa Vrdoljak

1161/BPI

**USPOREDBA PROCESA
KISELINSKE I ALKALNE
PREDOBRADNE OTPADNE TRAVE
U VISOKOTLAČNOM
REAKTORU**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Maria Novaka te uz pomoć mag. ing. Nenada Marđetka. Diplomski rad je izrađen u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (OPB-SLS; šifra projekta 9717).

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

USPOREDBA PROCESA KISELINSKE I ALKALNE PREDOBRADE OTPADNE TRAVE U VIKOTLAČNOM REAKTORU

Josipa Vrdoljak, 1161/BPI

Sažetak: Održiva upotreba lignocelulozne biomase za razne biotehnološke procese, poput otpadne trave uključuje iskorištavanje svih ugljikohidrata prisutnih u njenim hidrolizatima. Zbog složene strukture otpadna trava mora prvo proći proces predobrade da bi se mogla primijeniti u procesu proizvodnje bilo kojeg visokovrijednog proizvoda. Cilj ovog rada bio je odrediti optimalne uvjete za kiselinsku i alkalnu hidrolizu otpadne trave u visokotlačnom reaktoru, u svrhu optimizacije procesa zbog dobivanja što većeg prinosa fermentabilnih šećera i nastanka što manje nusprodukata koji bi imali inhibitorni učinak na daljnju enzimsku hidrolizu ili neki drugi stupanj u procesu proizvodnje odabranog proizvoda. U ovom istraživanju ispitivan je utjecaj 0,5 %-tne sumporne kiseline te utjecaj 1 %-tne natrijeve lužine pri različitim temperaturama (160, 180 i 200 °C) kroz različita vremena zadržavanja (1, 5 i 10 minuta). Iz provedenog istraživanja najveće koncentracije fermentabilnih šećera: (21,31 g L⁻¹ksiloze, 7,71 g L⁻¹glukoze i 5,00 g L⁻¹arabnoze) zabilježene su u kiselinskom tekućem hidrolizatu pri temperaturi od 200°C i vremenu zadržavanja od 1 minute. U tekućoj fazi nakon kiselinske predobrade, kod prethodno navedenih uvjeta detektirane su i najviše koncentracije nusprodukata: 3,72 g L⁻¹ mравlje kiseline, 4,26 g L⁻¹ octene kiseline, 0,68 g L⁻¹ levulinske kiseline te 2046,05 mg L⁻¹ furana. Nakon lužnatog pretretmana najveći zabilježeni udio šećera bio je 91,6 % glukana u krutoj fazi hidrolizata pri temperaturi od 200 °C i $t_z=10$ min, dok su koncentracije inhibitora nakon alkalne predobrade u oba hidrolizata bile zanemarive.

Ključne riječi: kiselinska predobrada, alkalna predobrada, otpadna trava, visokotlačni reaktor, lignocelulozne sirovine

Rad sadrži: 62 stranice, 34 slike, 7 tablica, 79 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Mario Novak

Pomoć pri izradi: mag. ing. Nenad Marđetko

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Božidar Šantek
2. Doc. dr. sc. Mario Novak
3. Doc. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek
4. Prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjena)

Datum obrane: 19. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemistry engineering
Laboratory for Biochemistry engineering,
industrial microbiology and beer and malt technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

COMPARISON OF THE ACID AND ALKALINE PRETREATMENT OF HAY IN HIGH-PRESSURE REACTOR

Josipa Vrdoljak 1161/BPI

Abstract: Sustainable use of lignocellulosic biomass, such as hay, utilizes all the carbohydrates present in its hydrolysis. Due to the complex structure of lignocellulose, hay must first undergo a pretreatment process in order to be used in the production of any high value product. The goal of this research was to determine the optimal conditions for acid and alkaline hydrolysis of hay in a high-pressure reactor, and to optimize the process to obtain high yield of fermentable sugars and achieve as less as possible by-products that have an inhibitory effect on further enzymatic hydrolysis or some other degree of utilization of selected production. In this study, the effect of 0,5% sulfuric acid and effect of 1% sodium hydroxide were studied with the influence of different temperatures (160, 180 and 200 ° C) at different retention times (1, 5 and 10 minutes). From the proven studies, the highest concentration of fermentable sugars (21,31 g L⁻¹ xylose, 7,71 g L⁻¹ glucose and 5,00 g L⁻¹ arabnosis) were recorded in acid liquid hydrolyzate at 200 ° C and during retention time of 1 minute. Highest concentrations of by-products: 3,72 g L⁻¹ formic acid, 4,26 g L⁻¹ acetic acid, 0,68 g L⁻¹ of levulinic acid and 2046,05 mg L⁻¹ furans were detected in the liquid phase after acid pretreatment, under same conditions. After alkaline pretreatment, the highest recorded sugar content was 91,6 % glucan in the solid phase of hydrolyzate at 200 ° C and $t_z = 10$ min, while the concentration of inhibitors after alkaline processing in both hydrolysates was negligible.

Keywords: acid pretreatment, alkaline pretreatment, hay, high-pressure reactor, lignocellulosic raw material

Thesis contains: 62 pages, 34 figures, 7 tables, 79 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD, Mario Novak, Assistant professor*

Technical support and assistance: *M. Sc. Nenad Marđetko*

Reviewers:

1. PhD, *Božidar Šantek*, Full professor
2. PhD, *Mario Novak*, Assistant professor
3. PhD, *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
4. PhD, *Jasna Novak*, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 19th, 2019

SADRŽAJ:

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO	2
2.1. Lignocelulozne sirovine.....	2
2.1.1. Građa lignocelulozne sirovine	2
2.1.1.1. Celuloza	3
2.1.1.2. Hemiceluloza	4
2.1.1.3. Lignin.....	4
2.1.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina	6
2.1.2.1. Fizikalne metode	8
2.1.2.2. Kemijske metode.....	11
2.1.2.2.1. Kiselinska predobrada	12
2.1.2.2.2. Alkalna predobrada.....	13
2.1.2.3. Fizikalno-kemijske metode	15
2.1.2.4. Biološke metode.....	16
2.1.3. Nastajanje inhibitora tijekom procesa predobrade.....	18
2.2. Primjena otpadne trave kao lignocelulozne sirovine	20
3. EKPERIMENTALNI DIO	23
3.1. Materijali	23
3.1.1. Sirovina	23
3.1.2. Kemikalije	24
3.1.3.1. Mlin čekičar	25
3.1.3.2. Visokotlačni reaktor	25
3.1.3.3. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC).....	27
3.1.3.4. Ostala oprema	28
3.2. Metode rada	29
3.2.1. Priprema sirovine	29
3.2.2. Određivanje sastava početne sirovine korištene za predobradu u visokotlačnom bioreктору	29
3.2.3. Predobrada lignocelulozne sirovine.....	29
3.2.4. Analitičke metode.....	30
3.2.4.1. Određivanje suhe tvari u lignoceluloznoj sirovini.....	30
3.2.4.2. Dvostupanjska kiselinska hidroliza	31
3.2.4.3. Određivanje udjela topivog lignina	31
3.2.4.4. Određivanje udjela netopivog lignina	32
3.2.4.5. Određivanje ukupnih furana.....	32
3.2.5. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).....	32
3.2.6. Određivanje koncentracije proteina metodom po Kjeldahl-u.....	33

4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. Kiselinska hidroliza otpadne trave u visokotlačnom reaktoru	35
4.2. Alkalna hidroliza otpadne trave u visokotlačnom reaktoru	44
5. ZAKLJUČCI	52
6. LITERATURA	54
7. PRILOZI	62
7.1. Baždarni pravci za određivanje koncentracije ugljikohidrata i kiselina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).....	62

1.UVOD

Zbog velike rasprostranjenosti u prirodi i relativno niske cijene, lignocelulozne sirovine postaju zanimljive za primjenu u biotehnologiji. Velike količine lignocelulozne biomase koja se smatra otpadom (otpadna trava, oklasci, komušina, drvene strugotine itd.) zbrinjava se spaljivanjem, ili se tradicionalno koristi za ishranu stoke unatoč njenom velikom potencijalu za primjenu u proizvodnji različitih visokovrijednih proizvoda kao što su biogoriva, biokemikalije i biopolimeri (Howard i sur., 2003).

Kako je lignoceluloza vrlo otporna na mikrobnu razgradnju, prije korištenja lignoceluloznih sirovina u različitim bioprocima potrebno je provesti predobradu ovakve sirovine. Ciljevi postupka predobrade su povećanje poroznosti lignocelulozne sirovine, uklanjanje lignina i hemiceluloze te smanjenje kristalčnosti celuloze (Marđetko i sur., 2018). Procesi predobrade koji se provode mogu se podijeliti na: fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke postupke predobrade. Izbor metode za predobradu ovisi o sastavu sirovine i nusproduktima koji nastaju određenim postupkom. Predtretman može biti najskuplji korak u pretvorbi lignocelulozne biomase u željeni proizvod, ali ima veliki potencijal povećanja učinkovitosti i smanjenja troškova kroz daljnje istraživanje i razvoj (Kumar i sur., 2009).

Cilj izrade ovog diplomskog rada bio je provesti predobradu otpadne trave kao lignocelulozne sirovine s kemijskim metodama: kiselinskom hidrolizom i alkalnom hidrolizom u visokotlačnom reaktoru, te usporediti dobivene rezultate kako bi se vidjelo koji je proces učinkovitiji. Ispitivan je utjecaj 0,5 %-tne sumporne kiseline te utjecaj 1 %-tne natrijeve lužine pri različitim temperaturama (160, 180 i 200 °C) kroz različita vremena zadržavanja (1, 5 i 10 minuta).

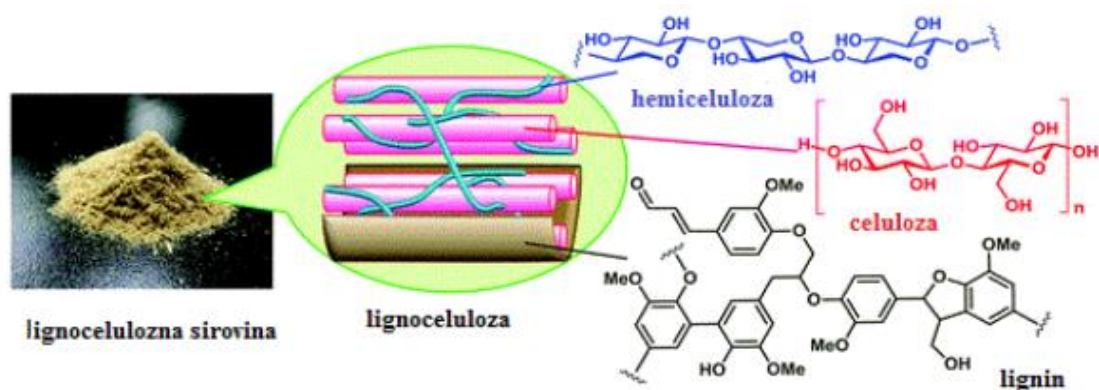
2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Lignocelulozne sirovine predstavljaju najzastupljeniji oblik biomase i time najveći obnovljiv izvor organskog materijala u svijetu (Matoković, 2018). U lignocelulozne sirovine spadaju poljoprivredni otpadci (stabljika, oklasak i komušina kukuruza, trava, sijeno, bagasa šećerne trske), otpaci drvoprerađivačke industrije (piljevina i strugotine, otpadci papirne industrije), otpadci prehrambene industrije, energetske usjevi i komunalni otpadni papir (Ivančić Šantek i sur., 2016). Za razliku od sirovina na bazi šećera i škroba, za koje treba omogućiti odgovarajuće uvjete poljoprivredne proizvodnje, a također se koriste i za ishranu ljudi i životinja, lignocelulozna biomasa ne zahtjeva ekstenzivnu pripremu zemlje za proizvodnju i ne koristi se direktno za proizvodnju hrane (Cordona i Sanchez, 2008). Unatoč svim prednostima, ograničavajući faktor u korištenju ove sirovine je kompleksnost njene obrade, jer je zbog složene strukture neophodan predtretman same sirovine (Predojević, 2010).

2.1.1. Građa lignocelulozne sirovine

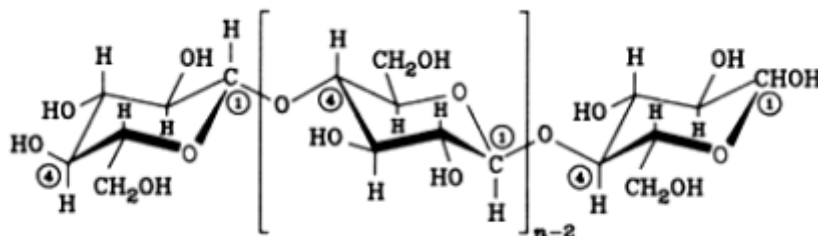
Kemijski sastav biljaka znatno se razlikuje zbog generičkih i ekoloških čimbenika. Glavna građevna jedinica biljaka je lignoceluloza (Slika 1.) koja je kompaktna, djelomično kristalizirana struktura koju grade linearan polisaharid celuloza (30-50%), razgranati heteropolisaharid hemiceluloza (20–30 %) i razgranati lignin (10–25 %). To su polimeri koje biljke proizvode u svojim stanicama, a njihov udio u strukturi razlikuje se ovisno o sirovini. Polimeri od kojih se sastoje lignocelulozni materijali međusobno su povezani jakim kovalentnim i slabijim nekovalentnim vezama, te tako tvore mikrofibrile koji kada se međusobno povežu čine makrofibrile (Chandel i sur., 2012).



Slika 1. Kemijski sastav lignocelulozne sirovine (Kobayashi i Fukuoka, 2013).

2.1.1.1. Celuloza

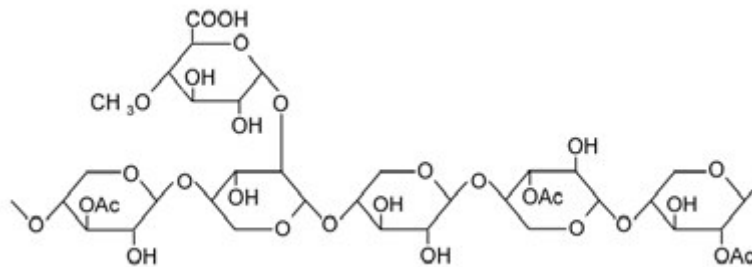
Celuloza je polisaharid sastavljen od D-glukočnih jedinica međusobno povezanih β -1,4-glikozidnom vezom u linearne lance (Slika 2.) koji najčešće sadržavaju od 2000 do 27000 glukočnih jedinica (Faraco, 2013). Kao najzastupljeniji polisaharid u lignoceluloznim sirovinama, celuloza čini oko 40-50% njene mase (Pandey i sur., 2011). Dugi paralelni lanci povezani su vodikovim i Van der Waalsovima silama koje daju celulozi visok stupanj molekulske uređenosti. Agregirane molekule celuloze tvore mikrovlakna-fibrili koja su međusobno povezana i tvore vlakna-mikrofibrile. Vlaknasta struktura i intermolekulske veze čine celulozu otpornom na mehaničko rastezanje, slabo topljivom u otapalima i otpornom na enzimsku hidrolizu s celulazama. Nativna celuloza pretežito je kristalna, a tek je manji dio amorfan. U odnosu na kristalna područja, amorfna područja su pogodna za kemijsku i enzimsku hidrolizu. Celulozna vlakna u stjenkama viših biljaka povezana su s ligninom i hemicelulozom (i drugi polimeri, npr. pektin) dajući im čvrstoću (Mohan i sur., 2006).



Slika 2. Prikaz strukture lanca celuloze (Bakker i sur., 2010).

2.1.1.2. Hemiceluloza

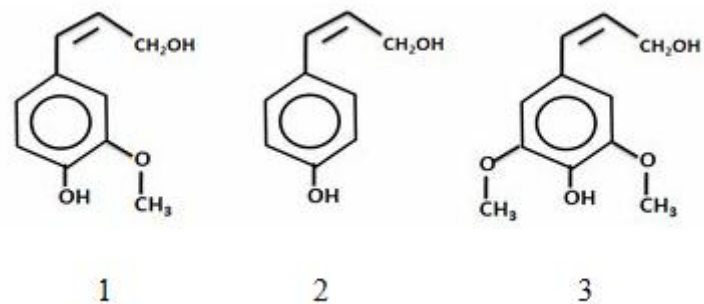
Hemiceluloza je amorfni polimer čije su glavne građevne jedinice ksilani (D-ksiloze povezane β -1,4 glikozidnim vezama), glukomanani (polimeri sastavljeni od D-glukoze i D-manoze) i galaktani (polimeri sastavljeni od D-galaktoze) koji čine osnovni lanac, dok se bočni lanac sastoji od galaktoze, arabinoze i raznih uronskih kiselina (Anonymus 1, 2008). Hemiceluloza ima nasumičnu, razgranatu i manje stabilnu strukturu od celuloze. Zbog grananja tvori amorfnu strukturu (Slika 3.) koja se lakše hidrolizira. Kovalentno je vezana za lignin, nekovalentno za celulozu i stvarajući čvrstu vezu u lignoceluloznoj sirovini između lignina i celuloze ponaša se kao „ljepilo“ (Chandel i sur., 2012).



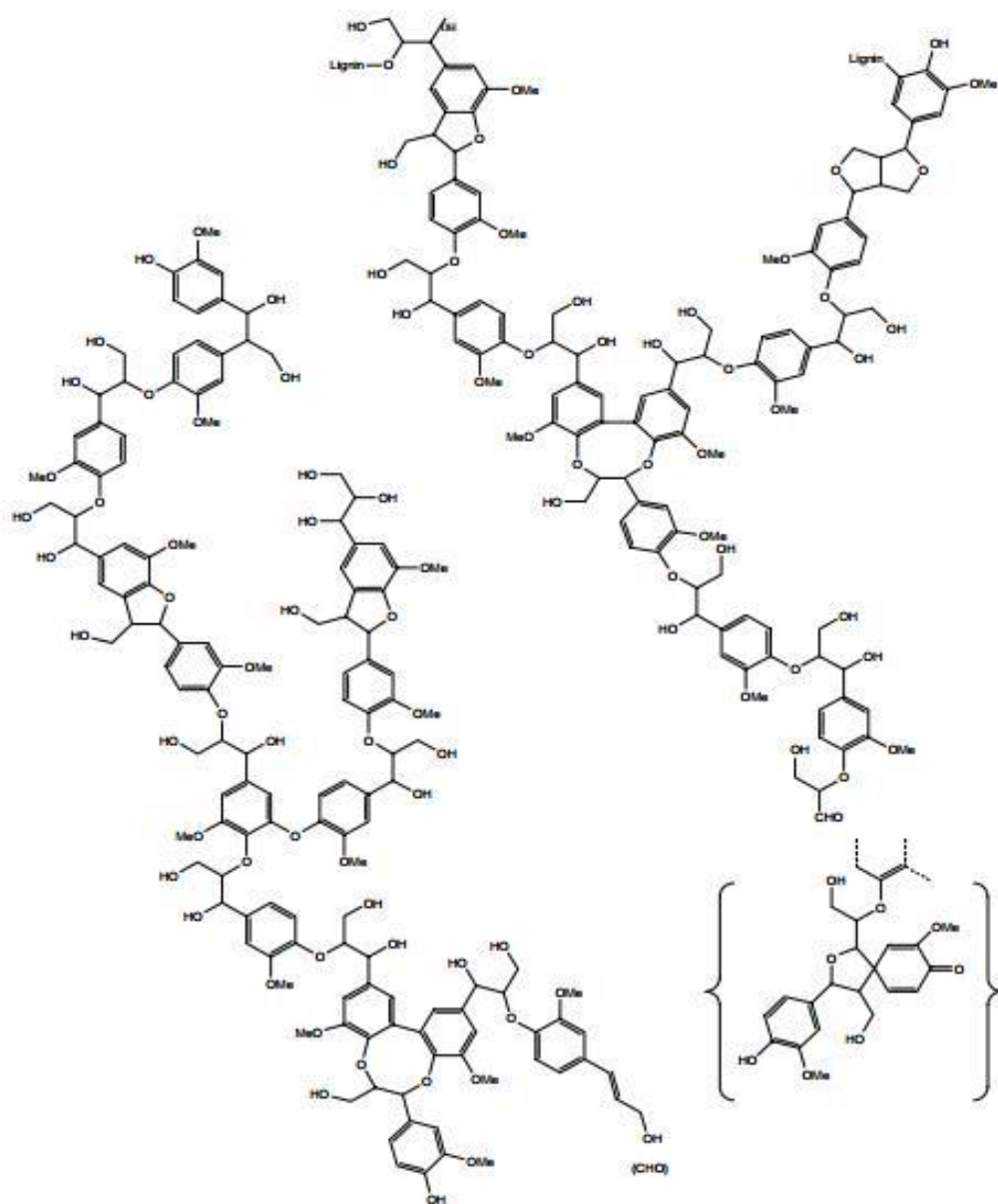
Slika 3.Struktura hemiceluloze (San Miguel i sur., 2011).

2.1.1.3. Lignin

Lignin je amorfni aromatski polimer koji se sastoji od fenilpropanskih jedinica najčešće kumaril alkohola, sinapil alkohola i koniferil alkohola (Slika 4.) koji su međusobno povezani esterskim vezama u vrlo kompleksni trodimenzionalni matriks (Slika 5; Demirbas, 2008). Biljke koje su starije i imaju više drvenastog tkiva, u staničnoj stjenci sadržavaju veći postotak lignina što im daje određenu krutost i čvrstoću, te na taj način čine stanice nepropusnima za vodu i manje propusnima za patogene mikroorganizme (Van Dyk i Pletschke, 2012).



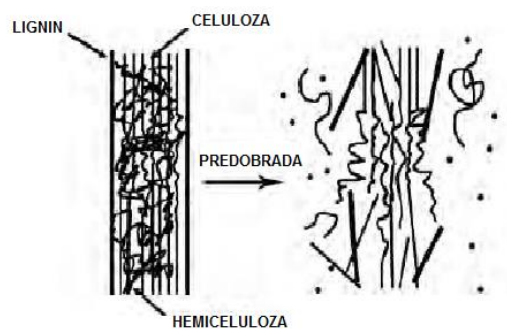
Slika 4. Građevne jedinice lignina: 1-koniferil-alkohol, 2-kumaril-alkohol, 3-sinapil-alkohol (Sederoff i sur., 1999).



Slika 5. Struktura lignina (Laine, 2005).

2.1.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina

Zbog kompleksnosti strukture lignoceluloznih sirovina, najveći izazov u proizvodnji biotehnoloških proizvoda je upravo predobrada biomase (Slika 6; Demirbas, 2005). Predobrada djelomično ili potpuno hidrolizira hemicelulozu, uklanja lignin čija velika količina može imati inhibitorno djelovanje i smanjuje količinu kristalne celuloze (Bačinić, 2016). Ciljevi učinkovite predobrade su uklanjanje lignina i hemiceluloze, reduciranje kristalčnosti celuloze te povećanje poroznosti lignocelulozne sirovine. Postupci predobrade moraju zadovoljavati sljedeće kriterije: visoki prinosi fermentabilnih šećera (glukoze, manoze, galaktoze, ksiloze, arabinoze) tijekom predobrade ili povećanje učinkovitosti kasnije enzimske hidrolize, tijekom predobrade ne smije doći do razgradnje ili gubitaka ugljikohidrata, treba izbjeći nastajanje nusproizvoda (fenolni spojevi, furani, slabe kiseline) koji inhibitorno djeluju na proces hidrolize i/ili fermentacije te se treba postići ekonomska održivost (Marđetko i sur., 2018).



Slika 6. Prikaz procesa predobrade lignocelulozne sirovine (Felby i sur., 2007).

Metode predobrade lignoceluloznih sirovina dijele se na:

- (i) fizikalne metode (mljevenje, ekstruzija, piroliza, gama zračenje, ultrazvuk, mikrovalovi),
- (ii) kemijske metode (kiseline, lužine, organska otapala, ionske tekućine, ozonoliza, tretman N-metilmorfolin-N-oksidom),
- (iii) fizikalno-kemijske metode (eksplozija parom, ammonia fiber/freeze explosion predtretman i mokra oksidacija),
- (iv) biološke metode (mikroorganizmi, enzimi) (Rezić, 2012).

Dostupnost šećera u lignoceluloznim sirovinama, kao što je otpadna trava, uvelike ovisi o korištenom postupku predobrade (Marđetko i sur., 2018). Treba pažljivo proučiti svaki od postupaka i odrediti onaj najbolji i najefikasniji jer se samim postupkom predobrade neposredno utječe na sve korake koji slijede u procesu proizvodnje određenog proizvoda tj. enzimsku hidrolizu, fermentaciju, izdvajanje i pročišćavanje proizvoda, obradu otpadnih voda te na utrošak energije za miješanje i energije u procesu izdvajanja i pročišćavanja proizvoda (Ivančić Šantek i sur., 2016). Pristupi metodama i učincima predobrade biomase razvijaju se od konvencionalnih, troškovno intenzivnih metoda, primjenom oštrih kemikalija i konvencionalnog grijanja prema ekološki prihvatljivijim i učinkovitijim metodama (zelene kemikalije, velike održive tehnologije). Takav pomak je od posebnog značaja zbog složene strukture lignocelulozne biomase, pri čemu su koraci predobrade ključni za učinkovitu pretvorbu biomase. Stoga je razvoj učinkovitih tehnologija još uvijek izazov na tom području (Hassan i sur., 2018).

2.1.2.1. Fizikalne metode

Primjenom fizikalnih metoda (Tablica 1.) kod predobrade lignoceluloznih sirovina osigurava se povećanje kontaktne površine i pora lignocelulozne sirovine, smanjenje kristaličnosti celuloze i djelomična ili potpuna hidroliza hemiceluloze (Galić, 2017).

Mehaničkim usitnjavanjem i mljevenjem dolazi do smanjenja čestica lignocelulozne sirovine čime se povećava kontaktna površina celuloze, smanjuje se njena kristaličnost što omogućava lakšu dostupnost enzimima za enzimsku hidrolizu. Za provođenje ovih operacija koriste se različite vrste mlinova (mlin čekičar, kugličn mlin i dr.). Potrebna količina energije za ovakav predtretman je relativno velika te zavisi od karakteristika same sirovine i krajnje veličine čestice koja se dobiva usitnjavanjem (Bačinić, 2016). Prema Zhu i Zhuang (2012) usitnjavanje zelene biomase mlinom čekičarom zahtjeva energiju od 0,05 kWh po kilogramu biomase.

Ekstruzija podrazumijeva povećanje volumena ili rastezanje lignoceluloznog materijala toplinom, što uzrokuje pucanje vlakana i oslobađanje manjih komadića celuloze. Postupak ekstruzije uključuje podvrgavanje lignoceluloznog materijala pregrijanoj vodenoj pari pod tlakom u trajanju od 2 do 20 minuta i zatim spuštanje tlaka na razinu atmosferskog. Dolazi do isparavanja vode u lignoceluloznom materijalu te se on brzo rasteže i raspada u manje komadiće veće poroznosti (Car, 2015).

Piroliza je termički proces razgradnje organskih materijala primjenom topline. Ujedno je i prvi korak u rasplinjavanju (konverziji biomase u plin) te se javlja u odsutnosti kisika ili pri jako niskim koncentracijama kisika što je razlikuje od procesa spaljivanja koje se može odvijati samo ako je kisik prisutan. Piroliza uzrokuje da se celuloza, hemiceluloza i dio lignina u biomasi raspadaju u manje molekule u plinovitom obliku (vodik, ugljikov monoksid). Kad se ohlade, ti se plinovi kondenziraju u tekuće stanje i postaju bio-ulje (još znano kao pirolitičko ulje), dok ostatak izvorne mase (uglavnom preostali lignin) ostaje kao kruti biougljik i nekondenzirajući plinovi (Anonymus 2). Za razgradnju hemiceluloze temperature se kreću između 220 i 315 °C, za celulozu između 315 i 400 °C, dok je lignin puno teži za razložiti pri čemu temperature variraju između 160 i 900 °C (Chen i sur., 2007).

Lignocelulozne komplekse također se može depolimerizirati zračenjem gama zrakama koje cijepaju β -1,4-glikozidnu vezu prvenstveno u celulozi razlažući pritom sirovinu na vlakna i oligosaharide te zatim do disaharida celobioze. Ovom metodom povećava se kontaktna površina celuloze i smanjuje se njena kristaličnost čime se celuloza prevodi u vodotopivi oblik.

Troškovi posjedovanja i korištenja opreme za ovu operaciju su vrlo visoki, te je utjecaj na okoliš vrlo zabrinjavajući pa taj postupak nema industrijsku primjenu (Takacs i sur., 2000; Agbor i sur., 2011).

Još jedna od fizikalnih metoda predobrade lignocelulozne biomase je postupak mikrovalovima. Prednost mikrovalova je što kombiniraju brzo vrijeme zagrijavanja s nižim unosom energije od konvencionalnih strategija grijanja. Ova predobrada ozračivanjem stvara lokalizirane žarišne točke, koje otvaraju lignoceluloznu kompozitnu strukturu, čime se olakšava kasnija enzimska hidroliza (Sarkar i sur., 2012). Prema Hu i suradnicima (2008) uspješna kombinacija mikrovalne i kemijske predobrade lužinama rezultirala je poboljšanom enzimskom hidrolizom trave, a ključna prednost ove metode je mogućnost mnogo većeg udjela krute tvari u sirovini od metoda s konvencionalnim grijanjem.

Ultrazvuk je fizikalna metoda predobrade gdje ultrazvučni valovi stvaraju razlike tlaka unutar tekućeg medija čime dolazi do kavitacije odnosno pojave stvaranja mjehurića koji implzijom narušavaju kompleksnu lignoceluloznu strukturu. To se događa na frekvencijama izvan raspona zvuka, obično između 20 i 1000 kHz (Mason i Lorimer, 2002). Mehano-akustični učinci ultrazvuka rezultiraju mijenjanjem površinske strukture biomase i delignifikacijom čime se omogućava poboljšanje kasnijeg procesa enzimske hidrolize. Metoda predobrade ultrazvukom zbog velikog utroška energije i nedovoljne istraženosti do sada je provedena samo u laboratorijskim i pilot postrojenjima (Bussemaker i Zhang, 2013).

Tablica 1. Usporedba prednosti i nedostataka fizikalnih metoda predobrade lignocelulozne sirovine

Metoda	Prednosti	Nedostaci	Reference
Mehaničko usitnjavanje	<ul style="list-style-type: none"> • povećanje aktivne površine celuloze • smanjenje kristaličnosti celuloze 	<ul style="list-style-type: none"> • veliki utrošak energije 	Bačinić, 2016
Ekstruzija	<ul style="list-style-type: none"> • razgradnja lignocelulozne sirovine na vlakna i usitnjavanje vlakana 	<ul style="list-style-type: none"> • veliki utrošak energije 	Kim i Dale, 2004
Gama zračenje	<ul style="list-style-type: none"> • povećanje kontaktne površine celuloze • smanjenje kristaličnosti celuloze 	<ul style="list-style-type: none"> • visoki troškovi-oprema • nemogućnost industrijske primjene zbog ekoloških razloga 	Takacs i sur., 2000 Agbor i sur., 2011
Piroliza	<ul style="list-style-type: none"> • nastanak plinovitih i tekućih produkata 	<ul style="list-style-type: none"> • visoka temperatura-utrošak energije • nastanak pepela 	Kumar i sur., 2009
Ultrazvuk	<ul style="list-style-type: none"> • veliki stupanj delignifikacije 	<ul style="list-style-type: none"> • veliki utrošak energije-nemogućnost provedbe u industrijskom mjerilu • nedovoljno istraženo 	Bussemaker i Zhang, 2013
Mikrovalovi	<ul style="list-style-type: none"> • manji utrošak energije od konvencionalnih strategija grijanja • narušavanje kompleksne lignocelulozne strukture 	<ul style="list-style-type: none"> • veliki utrošak energije • nedovoljno istraženo 	Sarkar i sur., 2012

2.1.2.2. *Kemijske metode*

Postoji širok spektar različitih kemijskih metoda predobrade (Tablica 2.) kojima se postiže povećanje kontaktne površine lignoceluloznog materijala, smanjenje stupnja polimerizacije, djelomična ili potpuna hidroliza hemiceluloze te djelomična razgradnja lignina. Za primjenu kemijskih metoda potrebno je koristiti opremu otpornu na agresivne kemikalije, a budući da prilikom takve predobrade nastaju toksični nusprodukti, nužno je provesti detoksifikaciju dobivenog predobrađenog materijala. Također, nužno je što više iskorištenih kemikalija reciklirati, tj. vratiti u novi proces, a ostatak odgovorno zbrinuti (Rezić, 2012). Neke od metoda predobrade su: predtretman kiselinom, predtretman lužinom, organosolv predtretman, ozonoliza, tretman N-metilmorfolin-N-oksidom, tretman ionskim tekućinama.

Ozonskim tretmanom sirovine postiže se smanjenje sadržaja lignina, dok je hemiceluloza slabije razgrađena, a celuloza ostaje intaktna (Kumar i sur. 2009). Ozonoliza se provodi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku te tijekom tretmana ne dolazi do nastanka inhibitornih i toksičnih nusproizvoda, međutim za provedbu samog tretmana su potrebne velike količine ozona, što ovaj proces čini veoma skupim i slabo korištenim.

Organosolv predtretman odnosno primjena organskih otapala je kemijska metoda kojom se omogućuje ekstrakcija lignina i djelomična ekstrakcija hemiceluloze iz sirovine, čime se povećava porozna struktura celuloze što omogućuje njenu daljnju enzimsku hidrolizu. Kao otapala koriste se niži alkoholi (metanol, etanol), viši alkoholi (etilen glikol, glicerol), organske kiseline, aceton i esteri. Proces se može odvijati sa ili bez katalizatora (oksalna i salicilna kiselina) u temperaturnom intervalu od 100 do 250 °C. Prednosti ove metode su lako uklanjanje organskog otapala destilacijom i njegovo ponovno vraćanje u proces te izdvajanje lignina u čvrstom obliku i šećera u tekućem obliku, ali visoka cijena otapala te troškovi pročišćavanja otapala zbog ponovnog korištenja su razlozi zašto ova metoda nema industrijsku primjenu (Karimi i Taherzadeh, 2008; Cheng i sur., 2009).

Ionske tekućine su soli koje se sastoje od velikih uglavnom organskih kationa i malih anorganskih aniona, s malim stupnjem kationske simetrije te vrelištem ispod 100 °C. Nezapaljive su te tekuće pri sobnoj temperaturi te imaju antistatičko djelovanje. Teško su hlapljive te posjeduju visoku termalnu stabilnost čak i pri temperaturama od oko 300 °C, te su stabilne u vodi (Bensah i Mensah, 2013). Ovom metodom se mješavina sirovine i ionske tekućine, ponekad u prisustvu vode i kiseline, inkubira pri temperaturama od 80 do 160 °C tijekom 10 minuta ili 24 sata. Više temperature i duža vremena zadržavanja povećavaju

efikasnost otapanja lignina (Perez-Pimienta i sur., 2013). Nakon toga se dodaje anti-otapalo (voda, metanol, aceton, etanol) kako bi došlo do taloženja celulozne frakcije. Supernatant se uklanja centrifugiranjem ili filtracijom, te se celuloza ispiri destiliranom vodom, liofilizira i podvrgava enzimskoj hidrolizi. Ionska tekućina i anti-otapalo se razdvajaju destilacijom.

N-metilmorfolin-N-oksid (NMMO) je učinkovito "zeleno" otapalo za otapanje celuloze koje se koristi u industrijskom mjerilu. Omogućuje učinkovito smanjenje kristalčnosti celuloze zbog visokog polariteta. Njegova N-O veza, koja razbija vodikove veze i Van der Waalove sile stabilizira celuloznu strukturu i oblikuje nove veze s otopljenom tvari (Teghammar i sur., 2012). Komercijalna otopina NMMO se zagrijava i koncentrira vakuumom, zatim se u pripremljeno otapalo dodaje lignocelulozni materijal te se dobivena smjesa miješa svaki 15 minuta na 130 °C 3 sata. NMMO se zatim regenerira dodatkom vruće destilirane vode, nakon čega slijedi vakuum filtriranje i ispiranje dok se ne pojavi bistri filtrat (Goshadrou i sur., 2013). Ovakvim postupkom može se postići regeneracija NMMO čak do 98% bez nastanka toksičnih nusprodukata (Liu i Sun, 2010).

2.1.2.2.1. Kiselinska predobrada

Zbog povoljne cijene anorganskih kiselina, najčešće se primjenjuje postupak predobrade sirovine sa koncentriranim ili razrijeđenim kiselinama kao što su klorovodična, sumporna, dušična ili fosfatna kiselina. U kiselim uvjetima hemiceluloza se reducira do monomera ksiloze, ostavljajući za sobom celulozu i lignin koji se onda mogu enzimski razgraditi do monomernih jedinica (Car, 2015). Postupak predobrade koncentriranim kiselinama provodi se na sobnoj temperaturi pri čemu dolazi do hidrolize 90 % suhe tvari sirovine. Međutim, kiseline su otrovne, korozivne i agresivne kemikalije za procesnu opremu i zahtijevaju reaktore koji su otporni na koroziju, što proces predobrade čini skupim te ih je na kraju provedenog procesa potrebno regenerirati kako bi proces bio ekonomski isplativ (Sun i Cheng, 2002; Kumar i sur., 2009). Nakon predobrade koncentriranim kiselinama potrebno je provesti neutralizaciju te ukoliko se za taj proces koristi gašeno vapno ili neka druga lužina nastaju netopljive soli koje se uklanjaju filtracijom te se zatim moraju primjereno zbrinuti što povećava troškove same proizvodnje (Gamez i sur., 2006; Rezić, 2012). Također, primjena koncentriranih kiselina rezultira razvojem toksičnih tj. inhibitornih spojeva za daljnji proces hidrolize i fermentacije, za razliku od uporabe razrijeđenih kiselina, te se zbog navedenih nedostataka, osobito u industrijskom mjerilu puno više koriste tretmani sa razrijeđenim kiselinama. Najčešće se koristi oko 0,5 %-tna sumporna kiselina pri visokim temperaturama ili

fosforna kiselina koja je manje agresivna od ostalih kiselina te stvara manje koncentracije inhibitornih spojeva poput furfurala i octene kiseline (Romero i sur., 2007). Kao jedan od glavnih nedostataka ove metode (osim korištenja visokih temperatura što zahtijeva veliki utrošak energije) izdvaja se mali prinos šećera tijekom provedbe procesa. Iako je sama brzina reakcije razrijeđenim kiselinama brža od nekih drugih pretretmana npr. enzimske hidrolize, osim hidrolize željenih komponenti dolazi i do razgradnje glukoze što nikako nije poželjno (Lenihan i sur., 2010). Kako bi se povećao prinos šećera odnosno stupanj konverzije celuloze u glukozu, primjenjuje se hidroliza u dva stupnja. U prvom stupnju se hemiceluloza hidrolizira pri relativno umjerenim uvjetima na temperaturi oko 170-190 °C pri čemu dolazi do oslobađanja šećera glukoze, galaktoze, arabinoze, ksiloze i manoze, dok se u drugom stupnju hidrolizat podvrgava ekstremnijim uvjetima na temperaturi između 200 i 230 °C, gdje se frakcija celuloze hidrolizira do glukoze. Prednosti ove metode su mala potrošnja kiselina i velika brzina reakcije (Alriksson, 2006). Također, korištenje razrijeđenih kiselina za obradu sirovih lignoceluloznih materijala jedno je od rješenja za smanjenje koncentracije toksičnih spojeva i ostataka otpada nakon pretretmana. Nakon takvog tretmana, kruti otpad (otpadna trava koja nije hidrolizirana) može se koristiti u daljnjem postupku kao polukruti/ kruti supstrat za uzgoj algi, kvasaca ili bakterija i proizvodnju biokemikalija (Tengerdy i Szaakcs, 2003; Mussatto i Teixeira, 2010).

2.1.2.2.2. Alkalna predobrada

Za pretretman lignoceluloznih sirovina mogu se koristiti neke lužine, a sami učinak alkalne predobrade ovisi o vrsti korištenog lignoceluloznog materijala, temperaturi procesa, vremenu zadržavanja te koncentraciji uporabljene lužine (Kumar i sur., 2009; Silverstein i sur., 2008). Alkalnom hidrolizom dolazi do razbijanja kompleksa lignin-ugljikohidrati tj. do pucanja veza između lignina i ugljikohidrata, dolazi do bubrenja i povećanja unutrašnje površine celuloze i smanjenja njezine kristaličnosti te do hidrolize esterske veze u hemicelulozi i povećanja poroznosti sirovine (Chen i sur., 2013). Pretretman lužinama može se voditi na nižim temperaturama i tlakovima u odnosu na druge metode, ali sa produženim vremenom trajanja postupka. Osim što se ovim procesom postiže učinkovito uklanjanje lignina, procesom se uklanjaju i skupine acetilnih i uronskih kiselina na hemicelulozi pri čemu se povećava dostupnost hemiceluloze djelovanju enzima prilikom provedbe enzimske hidrolize (Barrett i sur., 2009). Najčešće korištena lužina je natrijev hidroksid, ali se mogu koristiti amonijev hidroksid, kalijev hidroksid te kalcijev hidroksid koji se vrlo jednostavno može regenerirati iz hidrolizata reakcijom s ugljikovim dioksidom (Joshi i sur., 2011). U odnosu na pretretman

kiselinama, u predtretmanu s lužinama nastaje manje toksičnih i inhibitornih spojeva te je smanjen stupanj degradacije šećera, dok se kao nedostatak ove metode u odnosu na predtretman s kiselinama može izdvojiti cijena lužina i ograničenost procesa zbog mogućnosti odvijanja reakcije saponifikacije alkalija i intermolekularnih esterskih prstenova dobivenih razgradnjom veza ksilanima i drugim komponentama (Sun i Cheng, 2002).

Tablica 2. Usporedba prednosti i nedostataka kemijskih metoda predobrade lignocelulozne sirovine

Metoda	Prednosti	Nedostaci	Reference
Ozonoliza	<ul style="list-style-type: none"> • redukcija lignina • ne nastaje toksični otpad 	<ul style="list-style-type: none"> • potrebne velike količine ozona-ekonomski neisplativo 	Kumar i sur., 2009
Organosolv	<ul style="list-style-type: none"> • hidroliza lignina i hemiceluloze 	<ul style="list-style-type: none"> • otapalo treba koncentrirati i reciklirati-ekonomski neisplativo 	Kumar i sur., 2009
Ionske tekućine	<ul style="list-style-type: none"> • otapalo može biti ponovo korišteno u drugim metodama: pervaporaciji, reverznoj osmozi, ionskoj izmjeni • ekološki prihvatljiva metoda 	<ul style="list-style-type: none"> • nedovoljno istraženo 	Perez-Pimienta i sur., 2013 Agbor i sur., 2011
NMMO	<ul style="list-style-type: none"> • smanjenje kristaličnosti celuloze 	<ul style="list-style-type: none"> • laka regeneracija otapala • ekološki prihvatljiva metoda 	Teghammar i sur., 2012 Liu i Sun, 2010
Kiseline	<ul style="list-style-type: none"> • hidroliza hemiceluloze • narušavanje strukture lignina • velika brzina reakcije 	<ul style="list-style-type: none"> • veliki troškovi-korozija opreme • formiranje toksičnih spojeva • nastanak soli-potrebno adekvatno zbrinjavanje 	Kumar i sur., 2009 Alriksson i sur., 2006
Lužine	<ul style="list-style-type: none"> • povećanje kontaktne površine celuloze • uklanjanje lignina i hemiceluloze 	<ul style="list-style-type: none"> • potrebno dugo vrijeme zadržavanja u reaktoru • nemogućnost reciklacije lužine 	Kumar i sur., 2009

2.1.2.3. Fizikalno-kemijske metode

Fizikalno-kemijske metode (Tablica 3.) predstavljaju kombinaciju prije navedenih fizikalnih (Poglavlje 2.1.2.1.) i kemijskih (Poglavlje 2.1.2.2.) metoda, a neke od njih su mokra oksidacija, eksplozija vodenom parom i eksplozija amonijakom. Ako se odabrana fizikalno-kemijska metoda provodi bez upotrebe kemikalija prednosti su niži energetske troškovi, minimalna nužna upotreba kemikalija što dovodi do nastanka relativno niskih koncentracija inhibitornih spojeva, nema zahtjeva za zbrinjavanjem kemikalija i zahtjeva za posebnom procesnom opremom. Ovim metodama ne postiže se potpuna hidroliza hemiceluloze, ne može se postići zadovoljavajući postotak uklanjanja lignina, naročito ako je upotrebljena sirovina s povećanim udjelom lignina te se dobiva manji udio glukoze nakon predtretmana (Bajpai, 2016; Barrett i sur., 2009). Kod postupka mokre oksidacije lignocelulozna sirovina je uronjena u vodu te se tretira sa zrakom ili čistim kisikom pod visokim tlakom. Oksidacijski predtretman se odvija na temperaturi od 170 do 200 °C, tlaku kisika od 10 do 12 bara u trajanju od 10-15 minuta. Ovim postupkom se postiže rastvaranje hemiceluloze i lignina te izdvajanje celuloze (Alvira i sur., 2010). U skupinu fizikalno-kemijskih metoda predobrade ubrajamo i eksploziju vodenom parom koja je ujedno i jedna od najkorištenijih metoda za predobradu lignocelulozних sirovina. Usitnjena lignocelulozna sirovina se u ovom tretmanu izlaže utjecaju zasićene vodene pare visokog tlaka, koji se zatim naglo smanjuje, što dovodi do eksplozivne dekompresije čestica. Eksplozivno djelovanje vodene pare događa se u rasponu temperature od 160 do 260 °C, što odgovara tlaku od 0,69 do 4,83 MPa i traje od nekoliko sekundi do nekoliko minuta (Kumar i sur., 2009; Galbe i Zacchi, 2007). Metoda slična eksploziji vodenom parom je i metoda eksplozije vlakana amonijakom tzv. AFEX (eng, *ammonia fiber/freeze explosion*) koja se može primjenjivati za materijale koji sadrže i do 60% suhe tvari (Jørgensen i sur., 2007). Djelovanjem ovog tretmana lignocelulozni materijal tretira se tekućim amonijakom pri umjerenim temperaturama (90 do 100 °C) i pri visokom tlaku (17 -20 bara) tijekom 5 do 10 minuta. Iako nastaju manje koncentracije inhibitornih i toksičnih spojeva te se troši manje energije, nedostaci ovih metoda su smanjena uspješnost hidrolize hemiceluloze te manji prinos glukoze u odnosu na ostale metode (Eggeman i Elander, 2005).

Tablica 3. Usporedba prednosti i nedostataka fizikalno-kemijskih metoda predobrade lignocelulozne sirovine

Metoda	Prednosti	Nedostaci	Reference
Eksplozija vodenom parom (steam explosion)	<ul style="list-style-type: none"> • degradacija hemiceluloze i transformacija lignina • ekonomski isplativo 	<ul style="list-style-type: none"> • nastanak inhibitornih spojeva • nepotpuno kidanje veza u kompleksu lignin-ugljikohidrat 	Kumar i sur., 2009
Eksplozija amonijakom (AFEX)	<ul style="list-style-type: none"> • nastanak malih koncentracija inhibitornih i toksičnih spojeva • mali utrošak energije • povećanje dostupne površine celuloze 	<ul style="list-style-type: none"> • smanjena uspješnost hidrolize hemiceluloze • manji prinosi glukoze u odnosu na druge metode • neefikasna metoda za sirovinu sa visokim udjelom lignina 	Eggeman i Elander, 2005 Kumar i sur., 2009
Mokra oksidacija	<ul style="list-style-type: none"> • razgradnja hemiceluloze i lignina • mogućnost korištenja zraka umjesto kisika za smanjenje troškova 	<ul style="list-style-type: none"> • oksidirajuće sredstvo nema veliku selektivnost pa se kao rezultat mogu pojaviti gubitci celuloze i hemiceluloze • oksidacija lignina u topljive aromatske spojeve predstavlja rizik za nastanak inhibitora 	Agbor i sur., 2011 Hendricks i Zeeman, 2009

2.1.2.4. Biološke metode

Dobivanje fermentabilnih ugljikohidrata iz lignoceluloznih sirovina može se provesti biološkim metodama (Tablica 4.) koje obuhvaćaju predtretman enzimima ili mikroorganizmima koji mogu razgraditi lignocelulozu. Biološka predobrada osigurava delignifikaciju, djelomičnu hidrolizu celuloze i smanjenje stupnja polimerizacije. Mikroorganizmi koji vrlo uspješno razgrađuju lignocelulozni materijal su gljive bijelog i mekog truljenja koje prvenstveno razgrađuju lignin i hemicelulozu te gljive smeđeg truljenja koje efikasno razgrađuju celulozu. Od ostalih mikroorganizama za provođenje biološke predobrade primjenjuju se i bakterije, primjerice *Zymomonas mobilis* i druge vrste iz porodice *Lactobacillaceae* (Grubišić, 2017). Uz mikroorganizme, u industriji se za razgradnju

lignoceluloze koriste i enzimi hidrolaze i oksidoreduktaze. Djelovanje enzima pri razgradnji lignoceluloze je sinergističko, što znači da se istodobnim djelovanjem više enzima postiže veća aktivnost nego u slučaju kada se enzimi koriste pojedinačno (Van Dyk i Pletschke, 2012). U prošlim vremenima istraživanja su bila fokusirana na konverziju celuloze u glukozu, međutim u današnje vrijeme istraživanja se usmjeravaju na uporabu ostalih heksoza, ali i pentoza za fermentaciju jer se na taj način mogu povećati teorijski prinosi te značajno poboljšati ekonomičnost procesa. Navedene činjenice su utjecale na primijenjene vrste predobrade i na enzime potrebne za hidrolizu (Jørgensen i sur., 2007; Van Dyk i Pletschke, 2012). U industrijskoj primjeni se najčešće koriste enzimi endoglukanaza, egzoglukanaza i β -glukozidaza za razgradnju celuloze, ksilanaza za razgradnju hemiceluloze te fenolne oksidaze (lignin peroksidaza, mangan peroksidaza i lakaza) za razgradnju lignina (Sun i Cheng, 2002). Najveća prednost ovakve predobrade zasigurno je mali utrošak energije. Korištenje manje kemikalija te blagi uvjeti provođenja procesa također se mogu navesti kao prednosti ove „zelene“ metode, dok se kao nedostatak može izdvojiti nedovoljno efikasna hidroliza te duže trajanje samog procesa u odnosu na ostale metode (Kumar i sur., 2009).

Tablica 4. Usporedba prednosti i nedostataka bioloških metoda predobrade lignoceluloznih sirovina

Metoda	Prednosti	Nedostaci	Reference
Enzimi	<ul style="list-style-type: none"> • mali utrošak energije • ekološki prihvatljiva metoda 	<ul style="list-style-type: none"> • dugo trajanje procesa • nedovoljno efikasna hidroliza • sinergističko djelovanje enzima ima veći učinak 	Kumar i sur., 2009
Mikroorganizmi	<ul style="list-style-type: none"> • mali utrošak energije • nema korištenja kemikalija • blagi uvjeti odvijanja procesa 	<ul style="list-style-type: none"> • dugo trajanje procesa • nedovoljno efikasna hidroliza • različiti mikroorganizmi razgrađuju različite komponente lignocelulozne sirovine 	Kumar i sur., 2009

2.1.3. Nastajanje inhibitora tijekom procesa predobrade

Osim šećera, tijekom procesa predobrade, zbog korištenja ekstremnih uvjeta (visoki tlakovi, visoke temperature, agresivne kemikalije) dolazi do nastanka velikog broja toksičnih spojeva (Slika 7.) koji mogu imati inhibitorno djelovanje na aktivnost enzima i radni mikroorganizam (u daljnjem procesu fermentacije). Na sastav i količinu nastalog toksičnog spoja utječe odabrana metoda predobrade.

Spojevi koji imaju inhibitorni učinak mogu se podijeliti na:

(i) furane (furfural i 5-hidroksimetilfurfural (HMF)),

(ii) fenolne spojeve,

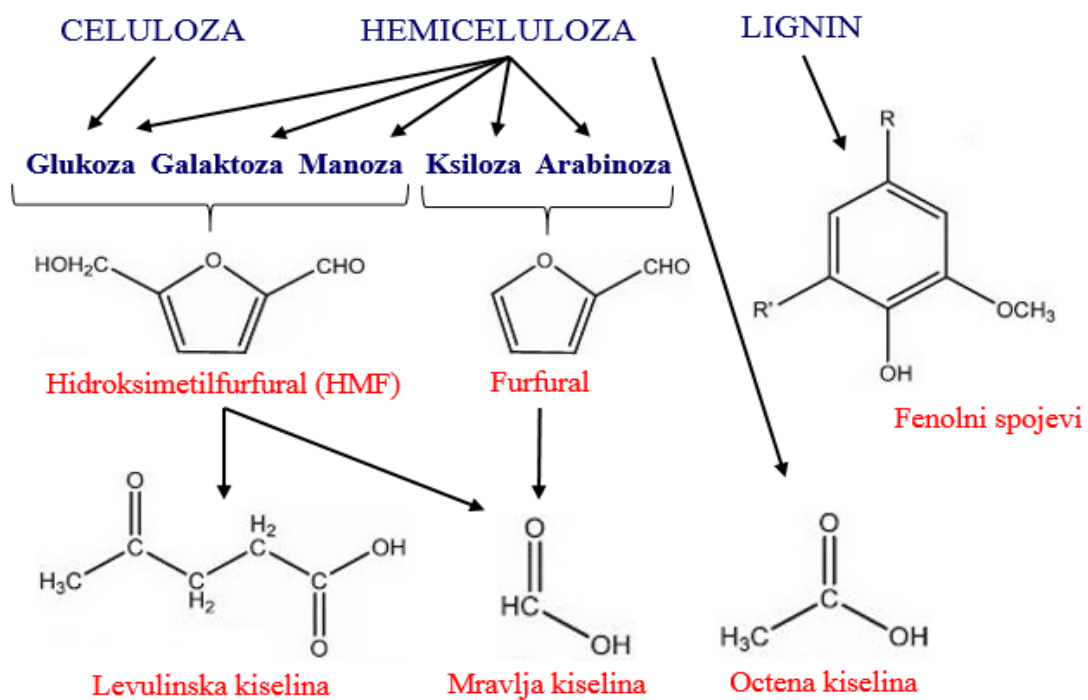
(iii) slabe kiseline (mravlja kiselina, octena kiselina i levulinska kiselina) (Jiang i sur., 2006).

Furanski spojevi furfural i 5-hidroksimetilfurfural (HMF) nastaju degradacijom pentoza odnosno heksoza. Furfural obično nastaje u manjim količinama nego HMF, međutim i ta koncentracija (oko 1 g L^{-1}) je često dovoljno visoka i ima inhibitorno djelovanje na radni mikroorganizam. Ovisno o koncentraciji nastalog furanskog spoja tijekom predtretmana lignocelulozne sirovine u daljnjem postupku enzimske hidrolize ili fermentacije može doći do inhibicije rasta ili produljenja lag faze kod radnog mikroorganizma (Almeida i sur., 2007).

Octena, mravlja i levulinska kiselina su najčešće slabe kiseline prisutne u lignoceluloznim hidrolizatima. Octena kiselina nastaje deacetilacijom hemiceluloze, dok su mravlja i levulinska kiselina proizvodi razgradnje HMF-a. Mravlja kiselina se može dodatno formirati iz furfurala pri kiselim uvjetima na povišenim temperaturama (Almeida i sur., 2017). Inhibitorni učinak slabih kiselina je objašnjen kao intracelularna akumulacija aniona. Prema toj teoriji anionski (disocirani) oblik kiseline nalazi se u unutrašnjosti stanice, dok nedisocirani oblik difundira u stanicu sve dok se ne postigne ravnoteža. To potvrđuje činjenica da mravlja kiselina ima veći inhibitorni učinak od levulinske kiseline koja pak ima veći inhibitorni učinak od octene kiseline (Palmqvist i sur., 1999; Almeida i sur., 2017).

Široki spektar fenolnih spojeva (vanilin, dihidrokoniferil alkohol, hidrokinon, acetogvajakon, homovanilinska kiselina, 4-hidroksibenzojeva kiselina) uglavnom nastaje razgradnjom lignina i to najčešće tijekom kiselinske hidrolize (Jiang i sur., 2016, Rezić i sur., 2016). Koji će spojevi nastati i u kojoj količini ovisi o izboru biomase, budući da lignin u različitim lignoceluloznim sirovinama ima različite stupnjeve metoksilacije te različiti stupanj umreženosti sa hemicelulozom i celulozom u staničnoj stijenci biljke (Perez i sur., 2002). U

fenolnim spojevima položaj supstituenta- *para*, *ortho* i *meta* utječe na toksičnost spoja. *Ortho* položaj utječe na toksičnost vanilina, dok metoksilni i hidroksilni supstituenti u *meta* i *para* položaju ne utječu na toksičnost spoja (Larson i sur., 2000). Fenoli se općenito smatraju inhibitornim spojevima za rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, utječući na njegovu fermentacijsku učinkovitost povećavajući lag fazu radnog mikroorganizma te utječu na smanjenje prinosa i produktivnosti procesa proizvodnje etanola (Cunha i sur., 2018).



Slika 7. Shematski prikaz nastajanja različitih inhibitora tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina (Jonsson i sur., 2013).

2.2. PRIMJENA OTPADNE TRAVE KAO LIGNOCELULOZNE SIROVINE

Korištenje obnovljivih lignoceluloznih sirovina za industrijske primjene, u današnje vrijeme, budi sve veću zainteresiranost zbog sve veće potražnje alternativa u svrhu očuvanja okoliša. Iako se otpadna trava najviše koristi kao stočna hrana, u posljednje vrijeme sve više nalazi svoju primjenu u industriji (bilo u nativnom ili sušenom obliku) u brojnim biotehnološkim procesima kao što su: proizvodnja biogoriva (bioetanola), proizvodnja bioplina, suspaljivanje s ugljenom i/ili samostalnim izravnim spaljivanjem za proizvodnju toplinske i/ili električne energije, u proizvodnji biokemikalija, u proizvodnji papira, u proizvodnji mliječne kiseline na polučvrstim supstratima, u proizvodnji aminokiselina te kao silaža.

Industrijska proizvodnja širokog raspona biokemikalija i sintetičkih polimera uvelike se oslanja na fosilna sredstva, međutim smanjenje tih resursa, zajedno s njihovim zastrašujućim učincima na okoliš, kao što je globalno zagrijavanje, počeli su ugrožavati budućnost industrije polimera (Furkan i Becer, 2015). Upotrebom lignocelulozne biomase kao sirovine koja ima veću količinu kisika, a niže udjele vodika i ugljika u odnosu na naftne resurse, te veliki izbor i dostupnost lignoceluloznih materijala (meko i tvrdo drvo, slama, trava itd.) omogućuju proizvodnju šireg spektra polimera i biokemikalija u lignoceluloznim biorafinerijama u odnosu na one na bazi nafte (Dale i Kim, 2005; Cherubini i Strømman, 2011).

Isto kao i za biokemikalije, potrebe za energijom i gorivima također ovise o sirovoj nafti te je u novije vrijeme veliki naglasak na alternativne odnosno obnovljive izvore energije. Upotrebom biljne biomase kao što su kukuruz, šećerna repa i šećerna trska proizvodi se biogorivo prve generacije dok se upotrebom lignoceluloznih sirovina proizvodi biogorivo druge generacije. Globalna proizvodnja biljne biomase iznosi oko 200×10^9 tona po godini od čega je preko 90% lignocelulozna biomasa (Saini i sur., 2014). Prema procjeni, lignocelulozna biomasa može se koristiti za generiranje oko 442 milijarde litara bioetanola godišnje, a ako se uzmu u obzir i ostaci usjeva te otpadne trave brojka se može povećati na 491 milijardi litara, što je oko 16 puta više od trenutne globalne proizvodnje (Kim i Dale, 2004; Sarkar i sur., 2012). Lignocelulozni materijal predstavlja obećavajuću opciju kao sirovina za proizvodnju etanola s obzirom na omjer izlazne / ulazne energije, dostupnost, nisku cijenu i veći prinos etanola (Saini i sur., 2014). Morrow i suradnici (2006) navode da bi zreli sustav proizvodnje bioenergije proizveo 330–380 litara etanola po toni suhe trave. Također, trava kao lignocelulozni materijal se ne koristi u prehrambenoj industriji te tako ne konkurira proizvodnji hrane što doprinosi financijskoj i društveno-političkoj stabilnosti države koja provodi ovakvu industriju. Otpadna poljoprivredna lignocelulozna sirovina jeftinija je od šećerne i škrobne sirovine, ali je

tehnološki značajno zahtjevnija jer je potrebno provesti odgovarajući način predobrade same sirovine za dobivanje krajnjeg visokovrijednog proizvoda.

Iako je drvo najzastupljenija sirovina za primjenu u proizvodnji papira, pitanja zaštite okoliša kao što su očuvanje šuma i smanjenje emisija CO₂ rezultirala su interesom za nedrvne izvore (nedrvne biljke i poljoprivredni ostaci), osobito u mediteranskim zemljama kao što su Španjolska, Italija i Grčka s nedovoljnim šumskim resursima. Nedrvne biljke, poput trave, nude nekoliko prednosti, uključujući niske cikluse rasta, umjerene zahtjeve za navodnjavanjem i gnojidbu i nizak sadržaj lignina što rezultira smanjenom potrošnjom energije i kemikalija u samom procesu proizvodnje papira i papirnatih proizvoda (Ververis i sur., 2004).

Otpadna trava također se može koristiti i kao polučvrsti supstrat za proizvodnju mliječne kiseline kao važnog proizvoda prehrambene, tekstilne, farmaceutske te brojnih srodnih industrija. Nakon predtretmana dobiveni hidrolizat koji sadrži fermentabilne šećere može se koristiti kao supstrat za bakterije mliječne kiseline koje procesom mliječne fermentacije proizvode mliječnu odnosno 2-hidroksipropionsku kiselinu.

Za proizvodnju bioplina također se koriste lignocelulozne sirovine. Kada se otpadna trava upotrebljava kao sirovina, može i ne mora se provoditi proces predobrade. Trava ne mora proći predobradu ako se uz postojeću radnu mješovitu kulturu može u fermentoru simultano odvijati i enzimski hidroliza i fermentacija, međutim ako se želi ubrzati proces fermentacije i postići veće iskorištenje same sirovine potrebno je najprije provesti predtretman sirovine kako bi se lignoceluloza razgradila na fermentabilne šećere koje onda radni mikroorganizmi mogu koristiti u daljnjem procesu nastanka bioplina, odnosno na samom koncu toplinske i /ili električne energije. Prema Mattioli i suradnicima (2017) prosječna proizvodnja od 500-600 m³ bioplina po toni krute tvari mogla bi se postići anaerobnom digestijom otpadne trave. Također, sadržaj metana u generiranom bioplinu iz trave kreće se između 52% i 56%, slično silaži kukuruza koja se najčešće koristi kao osnovna sirovina u bioplinskim postrojenjima (Anonymus 3).

Otpadna trava može se koristiti i za proizvodnju amiokiselina. Kao primjer jedne takve proizvodnje možemo uzeti zelenu biorafineriju GBR Gornja Austrija gdje su u laboratorijskom mjerilu i pilot postrojenju proizvedene aminokiseline iz zelene trave. Za pokuse u GBR Gornja Austrija, silažni sok je dobiven mehaničkim frakcioniranjem silaže. Za proizvodnju 1000 litara silažnog soka bilo je potrebno 2,6 tona silaže trave. Prvo su se bale trave izrezale i miješale nakon čega je silaža prebačena u prešu kako bi se odvojila kruta faza od tekuće faze odnosno silažnog soka. Nakon odvajanja faza, silažni sok prolazi ultrafiltraciju i nanofiltraciju te na kraju ionsku izmjenu kako bi se kao krajnji produkt izdvojile

aminokiseline. Iz dobivenih 1000 L silažnog soka proizvedeno je 17,4 kg ukupnih aminokiselina od čega najviše slijedećih: 1,47 kg aspartata, 1,24 kg glutamata, 1,96 kg alanina te 1,46 kg gama-butirične aminokiseline (Schaffenberger, 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sirovina

Korištena lignocelulozna sirovina bila je osušena usitnjena otpadna trava s 92 % suhe tvari, uzgojeno na području Zagorja. Sirovina je usitnjena na mlinu čekičaru (poglavlje 3.1.3.1.), a usitnjena sirovina koja je korištena u ovom eksperimentu prikazana je na Slici 8.



Slika 8. Suha otpadna trava usitnjena na mlinu čekičaru.

3.1.2. Kemikalije

Tablica 5. Čistoća i podrijetlo kemikalija za pripravu otopina i standarda za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač
celobioza	p.a.	Molekula, UK
glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
ksiloza	≥99 %, za biokemiju	Roth, Njemačka
arabinoza	za mikorbiologiju	Kemika, Hrvatska
mravlja kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
octena kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
furfural	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
demineralizirana voda	p.a.	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska
fosfatna kiselina	p.a., za HPLC	Fluka, Njemačka
sumporna kiselina	min. 96%, p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijeva lužina	p.a.	Kemika, Hrvatska

3.1.3.1. Mlin čekičar

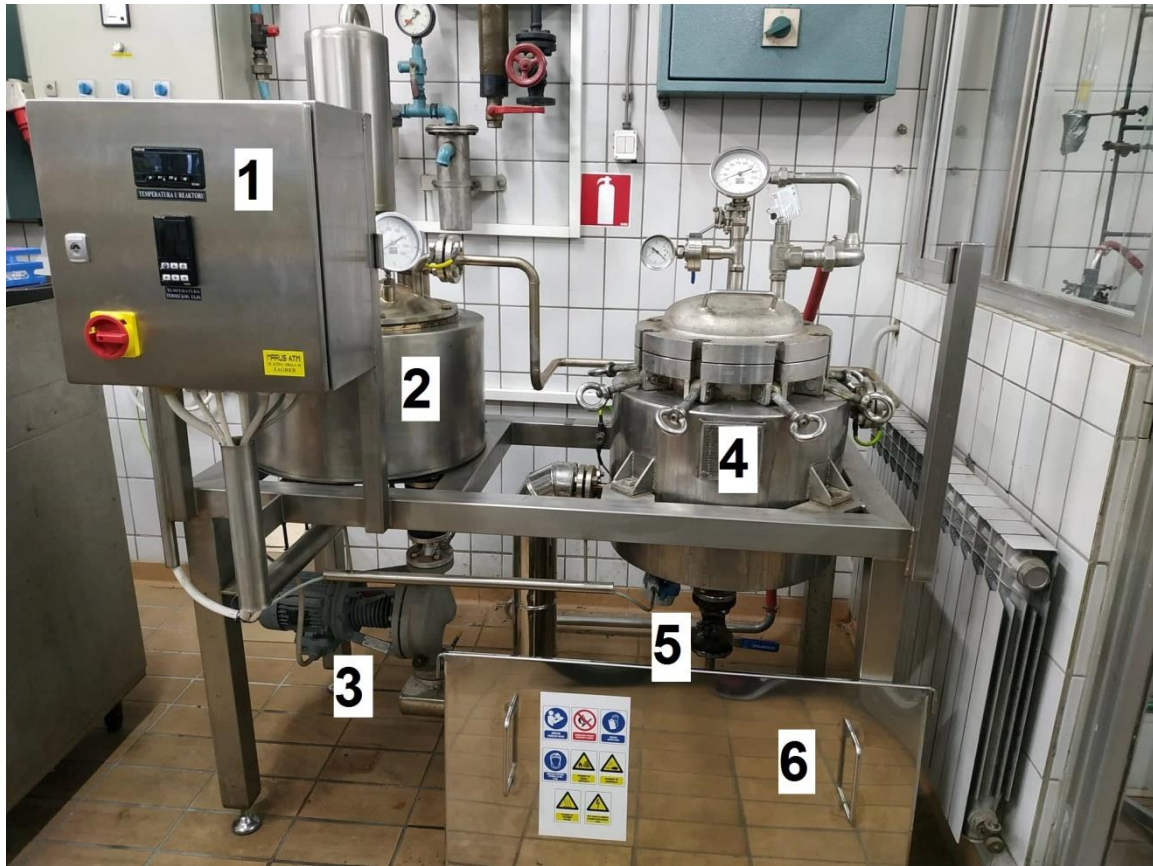
Za usitnjavanje lignocelulozne sirovine (otpadna trava) korišten je mlin čekičar –tip NA45 (Slika 9.). Mlin pokreće trofazni motor, a kapacitet mljevenja mlina u zrnu iznosi 300 kg h⁻¹, dok za mljevenje u klipku iznosi 250 kg h⁻¹. Mlin sadrži dvije vrste sita različitih veličina, 5 mm i 12 mm. Za usitnjavanje sijena u ovom diplomskom radu korišteno je sito veličine 5 mm.



Slika 9. Mlin čekičar tip NA45.

3.1.3.2. Visokotlačni reaktor

Za predobradu lignocelulozne sirovine korišten je sustav (Slika 10.) koji se sastoji od: perforirane košare zapremnine 20 L od nehrđajućeg čelika koja se nalazi u reaktoru u koju se stavlja sirovina, reaktorske posude u kojoj se zagrijava termičko ulje sa 3 električna grijača snage 1,0 kW, kontrolne jedinice preko koje se uspostavljaju uvjeti provedbe procesa, pumpe, ventila za ispuštanje tekućeg dijela te zaštitne jedinice. Uključivanjem sustava, uključuje se i pumpa koja recirkulira ulje kroz cijeli sustav te se preko plašta zagrijava reaktor za obradu sirovine. Nadzor procesa se vrši mjerenjem temperature ulja, temperature i tlaka u reaktoru sa sirovinom te temperature vodene pare nastale tijekom zagrijavanja. Nakon završetka procesa, pomoću ventila s gornje strane reaktora tlak se polako spušta. Kada dođe do izjednačenja tlaka u reaktoru s atmosferskim tlakom, tekući dio ispušta se otvaranjem ventila koji se nalazi na dnu reaktora, a kruti dio zaostaje u perforiranoj košari reaktora.



Slika 10. Visokotlačni bioreaktor (1-kontrolna jedinica, 2-posuda sa grijačima i termičkim uljem, 3-pumpa, 4-reaktor za predobradu sirovine, 5-ventil za ispust tekućeg dijela, 6-zaštitna jedinica).

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

HPLC (Slika 11.) je uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (Shimadzu CLASS – VP LC10A_{VP}, Shimadzu, Kyoto, Japan). Uređaj se sastoji od crpke (LC-10A_{VP}), otplinjača (DGU -14A), automatskog uzorkivača i injektora (SIL – 10 A_{VP}), uređaja za grijanje kolone (CTO – 10A_{VP}), analitičke kolone (ionsko – izmjenjivačka kolona Supelcogel HGuard Column, Sigma; Supelcogel™ C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9μM s predkolonom Supelcogel™ H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm), detektora indeksa loma (RID – 10A), modula zakontrolu sustava (SCL – 10 A_{VP}) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).



Slika 11. HPLC- Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP} sustav (Japan).

3.1.3.4. Ostala oprema

Uz laboratorijsko posuđe i potrošni laboratorijski materijal u izradi ovog rada korištena je i oprema prikazana u Tablici 6.

Tablica 6. Popis opreme i proizvođača korištenih u izradi rada

Oprema	Proizvođač
Tehnička vaga	Technica ET-1111, Slovenija
Analitička vaga	Sartorius, Njemačka
Centrifuga	Harrier 18/80, Sanyo, Velika Britanija
Sušionik	Instrumentaria ST-50, Hrvatska
UV/Vis spektrofotometar	„Cary 100, UV-VIS; Agilent Technologies“
Kvarcne kivete promjera 10 mm	HellmaOptikGmbH, Jena, Njemačka
pH metar 744	Metrohm, Švicarska
Oprema za filtraciju otopina	najlonski filter (0,22 µm, 47 mm; Magna, GE Water & Process Technologies, Michigan, SAD
Hladnjak i zamrzivač	Bosch, Njemačka

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema sirovine

Osušena otpadna trava je usitnjena u mlinu čekičaru-tip NA45. Usitnjena trava je prosijana kroz sito veličine pora od 5 mm te je čuvana u zatvorenoj kartonskoj kutiji pri sobnoj temperaturi.

3.2.2. Određivanje sastava početne sirovine korištene za predobradu u visokotlačnom reaktoru

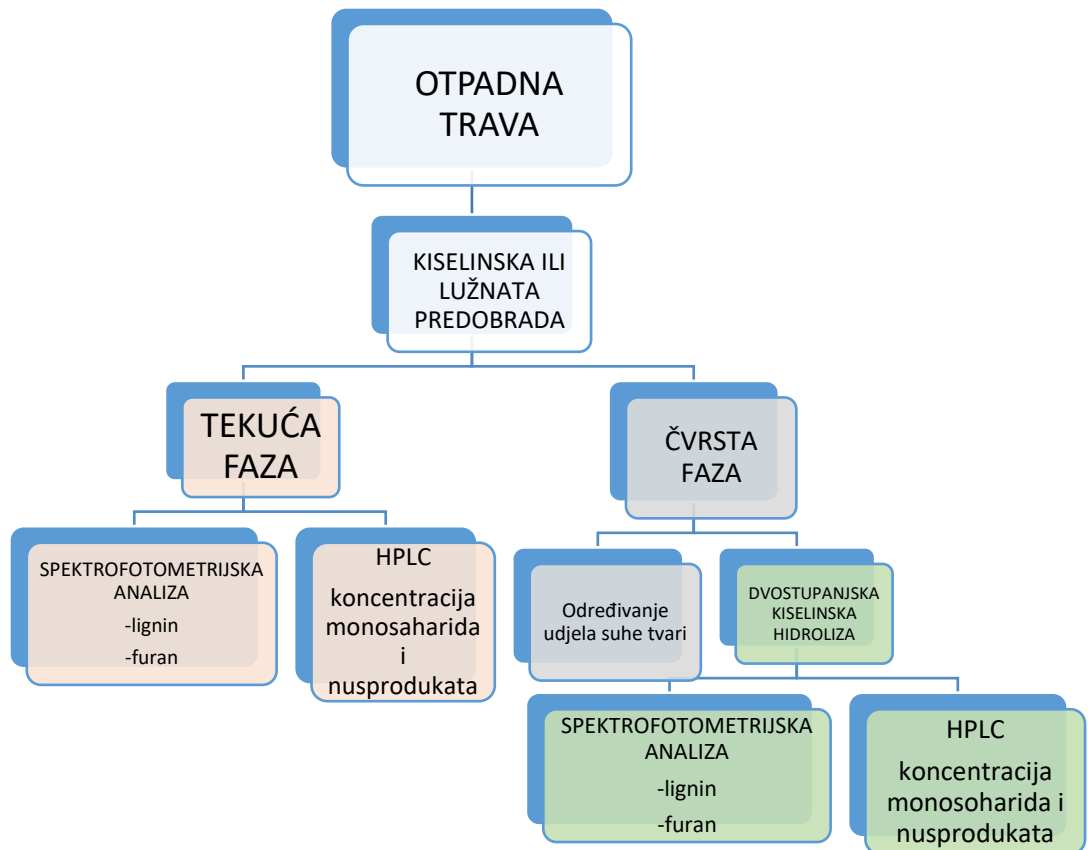
Sastav otpadne trave korištene u izradi ovog rada je određen tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti nakon provedene dvostupanjske kiselinske hidrolize prema Marđetko i suradnicima (2018).

3.2.3. Predobrada lignocelulozne sirovine

Odvagano je 500 g s.tv. suhe otpadne trave (s obzirom da je udio suhe tvari u travi 92%, odvagana masa iznosila je 550 g). Za kiselinsku predobradu sirovine pripravljeno je 10 L 0,5%-tne otopine H_2SO_4 na način da je 29 mL 96%-tne H_2SO_4 razrijeđeno sa 9,97 L vodovodne, dok je za predobradu sirovine lužinom pripravljeno 10 L 1 %-tne otopine NaOH na način da je 100 g NaOH otopljeno u 10 L vodovodne vode. Odvagana masa otpadne trave prenesena je metalnu košaru unutar visokotlačnog reaktora i zatim je dodan cijeli volumen pripravljene otopine za kiselinsku ili lužnatu predobradu. Predtretmani su provedeni na temperaturama 160 °C, 180 °C i 200 °C uz vrijeme zadržavanja od 1, 5 i 10 minuta. Na kontrolnoj jedinici se uključi sustav i prate se procesni parametri svakih 10 minuta sve dok se ne postignu zadani uvjeti. Nakon postizanja željene temperature i isteka ispitivanog vremena zadržavanja, tlak u reaktoru se izjednačava s atmosferskim i zatim se odvajaju čvrsta i tekuća faza koje se svaka posebno dalje analiziraju.

3.2.4. Analitičke metode

Shema postupka analize uzoraka nakon predobrade otpadne trave prikazana je na Slici 12.



Slika 12. Slika postupka analize otpadne trave nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru.

3.2.4.1. Određivanje suhe tvari u lignoceluloznoj sirovini

Uzorak lignocelulozne sirovine (otpadna trava) izvagan je i osušen na 100 °C do konstantne mase. Nakon sušenja uzorak je izvagan, te je određen udio suhe tvari prema jednadžbi [1]:

$$w(\text{suhe tvari}) = \frac{m(\text{poslije sušenja})}{m(\text{prije sušenja})} \cdot 100[\%] \quad [1]$$

3.2.4.2. Dvostupanjska kiselinska hidroliza

Dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom analizirani su uzorci otpadne trave prije i nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru kako bi se utvrdila koncentracija monosaharida te topivog i netopivog lignina. U epruvetu je dodano 0,4 g izvaganog suhog sijena zajedno s 4 mL 72 %-tne H₂SO₄. Sadržaj epruvete je promiješan staklenim štapićem kako bi sva sirovina bila u kontaktu s kiselinom. Nakon inkubacije epruvete na 30 °C jedan sat, sadržaj je prebačen u okruglu tikvicu s ravnim dnom, dodano je 112 mL demineralizirane vode te se smjesa kuhala 4 sata uz povratno hladilo. Sadržaj tikvice je povremeno promiješan protresanjem tikvice kako bi se minimalizirali gubitci uslijed hvatanja smjese na stijenke tikvice. Nakon kuhanja, smjesa u tikvici je ohlađena pod mlazom hladne vode i profiltrirana vakuum filtracijom kroz celulozni filter papir preko Büchnerovog lijevka. Filtrat je izdvojen za određivanje koncentracije topivog lignina i ukupnih furana te šećera tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, dok je zaostali kruti dio na filter papiru ispran naljevima vruće vode do pH 6 i prebačen u Petrijevu zdjelicu za sušenje i određivanje netopivog lignina.

3.2.4.3. Određivanje udjela topivog lignina

Od permeata filtracije nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize je izdvojen alikvot za određivanje topivog lignina spektrofotometrijom. Uređaj korišten za analizu je spektrofotometar „Cary 100, UV-VIS; AgilentTechnologies“. U uzorku snimljena je apsorbancija pri 205 nm u tri paralele. Zbog točnosti mjerenja i određivanja koncentracija, uzorak je pripremljen uz zadovoljavajuće razrjeđenje demineraliziranom vodom kako bi mu apsorbancija iznosila između 0,7 i 1. Udio lignina topivog u kiselini (LTK) je izračunat pomoću jednadžbe [2]:

$$LTK = \frac{A \cdot D \cdot V}{a \cdot b \cdot m} \quad [2]$$

A- apsorbancija uzorka na 205 nm

D- faktor razrjeđenja

V- volumen filtrata

a- konstanta, 110 g L⁻¹cm⁻¹

b-širina kivete, 1 cm

m- masa uzorka uzetog za analizu (0,4 g)

3.2.4.4. Određivanje udjela netopivog lignina

Isprani čvrsti dio zaostao na filter papiru nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize je prebačen u prethodno osušenu i izvaganu Petrijevu zdjelicu i osušen na temperaturi od 105 °C kroz 24 sata. Nakon sušenja, uzorak je ponovo izvagan te je određen netopivi udio lignina zaostao nakon kiselinske hidrolize. Udio netopivog lignina (LNTK) se izračunava prema jednadžbi [3]:

$$\text{LNTK} = \frac{m(\text{osušeni filter s talogom}) - m(\text{flitera})}{m(\text{uzorka čvrste faze uzetog u analizu})} \quad [3]$$

3.2.4.5. Određivanje ukupnih furana

Nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize izdvojen je alikvot (9 μL) iz tekućeg dijela te je razrijeđen tisuću puta demineraliziranom vodom (9 mL) i snimljena mu je apsorbancija spektrofotometrom pri 284 nm i 320 nm. Razlika ovih dvaju vrijednosti uzeta je za računanje ukupnih furana iz baždarnog dijagrama prema jednadžbi baždarnog pravca [4]:

$$\gamma(\text{furani}) = 2,469 \cdot \Delta A + 0,0158 \cdot R^2 \quad [4]$$

3.2.5. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC metodom analizirana je tekuća faza nakon kiselinske ili lužnate predobrade lignocelulozne sirovine te tekuća faza nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Uzorci su pripremljeni tako da je volumenu uzorka od 750 μL dodano 750 μL demineralizirane vode, te je uzorak stavljen na centrifugu (Harrier 18/80, Sanyo, Velika Britanija) na 10 000 g na 10 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je profiltriran pomoću šprice kroz najlonski filter s porama 0,22 μm. Za analizu je korišten kromatograski sustav Shimadzu CLASS-VPLC-10AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan). Kao pokretna faza korištena je otopina H₃PO₄ (0,1 % vol/vol) u vodi. Po 20 μL svakog uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od 55 °C i brzini protoka pokretne faze od 0,5 mL min⁻¹. Podaci su analizirani pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10. Iz jednadžbi baždarnih pravca navedenih u Prilogu 1. izračunate su koncentracije monosaharida i kiselina u analiziranim uzorcima.

3.2.6. Određivanje koncentracije proteina metodom po Kjeldahl-u

Određivanje koncentracije proteina odnosno koncentracije ukupnog dušika u čvrstoj fazi uzorka provodi se u tri koraka: spaljivanje uzorka, destilacija nastalog amonijaka i titracija amonijevog borata.

Za spaljivanje uzorka, u tikvicu po Kjeldahl-u odvagano je 1 g čvrste faze uzorka i dodano je 15 mL koncentrirane sumporne kiseline. Dobivena smjesa je kratko zagrijavana. Nakon hlađenja u smjesu je dodan katalizator te je nastavljeno zagrijavanje smjese, sve dok smjesa nije izgubila obojenje. Nakon toga je u smjesu dodano malo demineralizirane vode i 1-2 kapi vodikovog peroksida. Sadržaj tikvice je zagrijavan do ponovnog nestanka boje. Cjelokupan sadržaj tikvice nakon toga je prenesen u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjen demineraliziranom vodom do oznake.

Za destilaciju amonijaka korištena je aparatura po Parnas-Wagneru. U tikvicu za destilaciju otpipetirano je 10 mL uzorka iz odmjerne tikvice (nakon spaljivanja) i uzorku je dodano 10 mL otopine natrijevog hidroksida. Ovako pripremljen uzorak prenesen je kroz lijevak u posudu za destilaciju. Zagrijavanjem tikvice započela je destilacija amonijaka. Destilat se uvodio u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL s otopinom borne kiseline u koju su prethodno dodani indikatori. Nakon što je destilacijom prikupljeno oko 40 mL uzorka destilacija je zaustavljena. Dobiveni destilat titriran je klorovodičnom kiselinom do prelaska zelene boje u narančasto-crvenu boju. Opisani postupak potrebno je provesti i za slijepu probu kod koje je za destilaciju umjesto uzorka dodano 10 mL demineralizirane vode. Za svaki uzorak koncentracija ukupnog dušika (γ_N) izračunata je prema izrazu [5]:

$$\gamma_N = \frac{0,14 \cdot (a-b)}{\frac{V_1}{V_2} \cdot m} \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [5]$$

a-volumen otopine 0,01 mol L⁻¹ HCl utrošene za titraciju uzorka (mL)

b-volumen otopine 0,01 mol L⁻¹ HCl utrošene za titraciju slijepe probe (mL)

V₁-volumen uzorka koji je uzet za destilaciju (10 mL)

V₂-volumen razrijeđene otopine uzorka (100 mL)

m-masa uzorka uzetog za analizu (g)

Iz određene koncentracije ukupnog dušika može se izračunati koncentracija proteina (γ_{prot}) prema izrazu [6]:

$$\gamma_{\text{prot}} = \gamma_N \cdot 6,25 \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [6]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kao lignocelulozna sirovina u ovom radu korištena je otpadna trava kojoj je sastav određen dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom, a prikazan je u Poglavlju 4.1. Cilj ovog rada bio je odrediti optimalne uvjete za kiselinsku i lužnatu hidrolizu otpadne trave kao lignocelulozne sirovine u visokotlačnom reaktoru, u svrhu optimizacije procesa radi dobivanja što većeg prinosa fermentabilnih šećera i nastanka što manje nusprodukata koji bi imali inhibitorski učinak na daljnju enzimsku hidrolizu ili neki drugi stupanj u procesu proizvodnje određenog proizvoda. Da bi se odredili optimalni uvjeti proveden je niz eksperimenata gdje je ispitan utjecaj temperature i vremena zadržavanja na uspješnost procesa predobrade otpadne trave s 0,5 %-tnom sumpornom kiselinom i 1 %-tnom natrijevom lužinom u visokotlačnom reaktoru. Eksperimenti su, i u kiselom i lužnatom mediju provedeni pri tri različite temperature (160 °C, 180 °C, i 200 °C) na tri različita vremena zadržavanja (1 minuta, 5 minuta i 10 minuta). Nakon završenog procesa predobrade dobivene su dvije faze hidrolizata – tekuća i čvrsta faza. U svakoj od faza određenaje koncentracija šećera glukoze, ksiloze i arabinoze, te koncentracija nusprodukata: octene, mravlje i levulinske kiseline i ukupnih furana.

Učinkovitost hidrolize otpadne trave prikazana je kao saharifikacijski prinos (postotak hidrolizirane glukoze, ksiloze i arabinoze u usporedbi s njihovim početnim sadržajem u otpadnoj travi) ili kao koncentracija novonastalog šećera (glukoze, ksiloze i arabinoze) te kiselina (octene, mravlje i levulinske kiseline) u g L⁻¹ (Marđetko i sur., 2018).

Rezultati istraživanja podijeljeni su u sljedeća poglavlja:

- i)* kiselinska hidroliza otpadne trave u visokotlačnom reaktoru (Poglavlje 4.1.)
- ii)* alkalna hidroliza otpadne trave u visokotlačnom reaktoru (Poglavlje 4.2.)

Kako bi se otpadna trava mogla koristiti kao sirovina za proizvodnju bioetanol, biopolimera i biokemikalija potrebno je provesti predobradu da bi se ugljikohidratni polimeri preveli u fermentabilne šećere. Jedna od najčešće istraživanih metoda predobrade je predobrada razrijeđenom kiselinom. U ovom radu je kao katalizator za hidrolizu otpadne trave korištena sumporna kiselina, jedna od najjeftinijih i najčešće korištenih kiselina za predobradu lignocelulozne sirovine (Lenihani sur., 2009; Zhu i sur., 2009). U prethodno provedenim istraživanjima predobrade lignoceluloznih sirovina kao što su pšenična slama i kukuruzovina pokazalo se da smanjenje koncentracije sumporne kiseline s 1% na 0,5% rezultira značajnim smanjenjem koncentracije nusproizvoda procesa kao što su levulinska i mravlja kiselina

(Govedarica, 2016). Iz tih razloga za predobradu otpadne trave u ovom istraživanju korištena je 0,5 %-tna sumporna kiselina.

Predobrada lignoceluloznih sirovina lužinom može se izvoditi ili pri visokim temperaturama i niskoj koncentraciji lužine (hidroliza razrijeđenom lužinom) ili pri niskim temperaturama i visokoj koncentraciji lužine (hidroliza koncentriranom lužinom) (Taherzadeh, 2007). Za hidrolizu razrijeđenom lužinom najčešće se koriste 0,5 - 2 %-tne lužine, u temperaturnom intervalu od 121 do 210 °C (Vidović, 2017). Natrijev hidroksid, iako je skupa lužina, najčešće se koristi zbog svoje visoke alkalnosti za frakcioniranje raznih materijala uključujući i poljoprivredne ostatke i drvo. Razrijeđeni NaOH narušava strukturu biomase i povećava njenu poroznost te kida veze između lignina i ugljikohidrata. Visoke koncentracije lužine uglavnom doprinose povećanoj delignifikaciji biomase, međutim jako visoke koncentracije lužine (6-12 % w/w) mogu rezultirati otapanjem celuloze i smanjenim uklanjanjem lignina (Bensah i Mensah, 2013). Iz navedenih razloga za predobradu otpadne trave u ovom radu korištena je 1%-tna natrijeva lužina.

4.1. Kiselinska hidroliza otpadne trave u visokotlačnom reaktoru

U ovom poglavlju prikazani su rezultati dvostupanjske kiselinske hidrolize otpadne trave (Poglavlje 3.2.4.2., Materijali i metode). Analizom dobivenog hidrolizata pomoću visokoučinkovite tekućinske kromatografije (Poglavlje 3.2.5., Materijali i metode) određen je udio strukturnih ugljikohidrata u sirovini te je obradom rezultata dobiven sastav sirovine korištene u daljnjem istraživanju. Rezultati su prikazani u Tablici 7.

Tablica 7. Sastav otpadne trave

udio	W _{glukan}	W _{ksilan}	W _{arabinan}	W _{LTK}	W _{LNTK+pepeo}	W _{HAc}	W _{mravlja kis.}	W _{proteini}
	%	%	%	%	%	%	%	%
	30,14	14,59	2,46	2,88	28,94	1,77	0	14,79

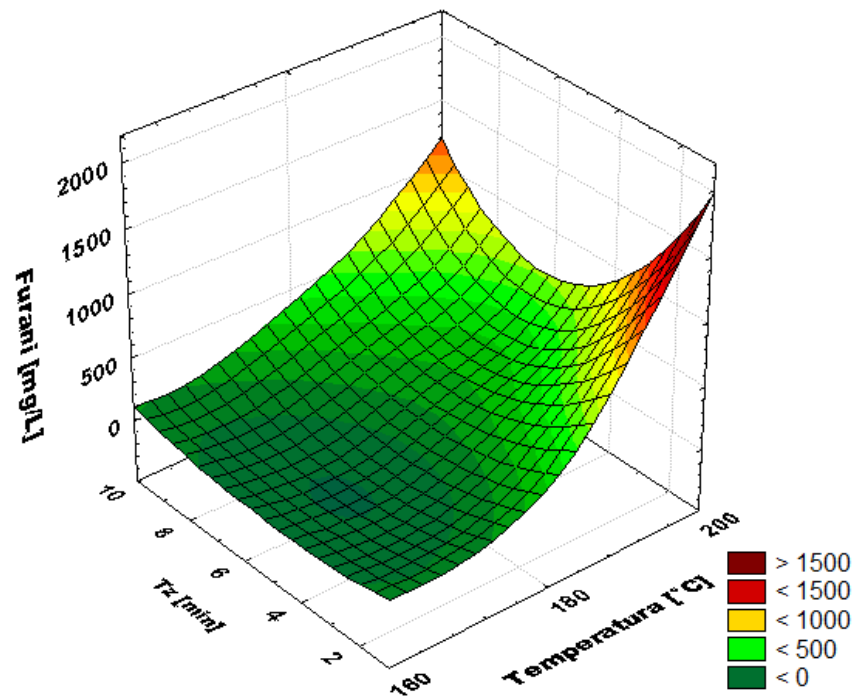
Otpadna trava prema literaturnim podacima sadržava: 25-40 % celuloze, 25-50 % hemiceluloze i 10-30 % lignina (Saini i sur., 2014). Prema radu autora Chena i suradnika, sastav otpadne trave je nešto drugačiji te ona sadržava od 28 do 38 % glukana u suhoj tvari, te 11-19 % ksilana i 1,5-3 % arabinana izraženih kao hemiceluloza (Chen i sur., 2007). Naime, sastav otpadne trave ovisi o korištenim vrstama, klimatskom pojasu njihovog uzgoja te o analitičkim metodama korištenim za određivanje njenog sastava. To su i mogući razlozi odstupanja sastava

analizirane slame od literaturnih podataka. Sastav otpadne trave korištene u ovom istraživanju određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Prema dobivenim rezultatima izračunati su udjeli ugljikohidratnih polimera, udio ukupnog lignina, te udio octene i mravlje kiseline koji su prikazani u Tablici 7. Udio glukana u analiziranoj otpadnoj travi iznosi 30,14 %, udio ksilana iznosi 14,59 % te udio arabinana iznosi 2,46 % što je u skladu s literaturnim navodima. Udio lignina topivog u kiselini (2,88 %) zajedno sa udjelom lignina netopivog u kiselini (LNTK) sa pepelom (28,94 %) iznosi 31,82 % što je također u skladu s literaturom.

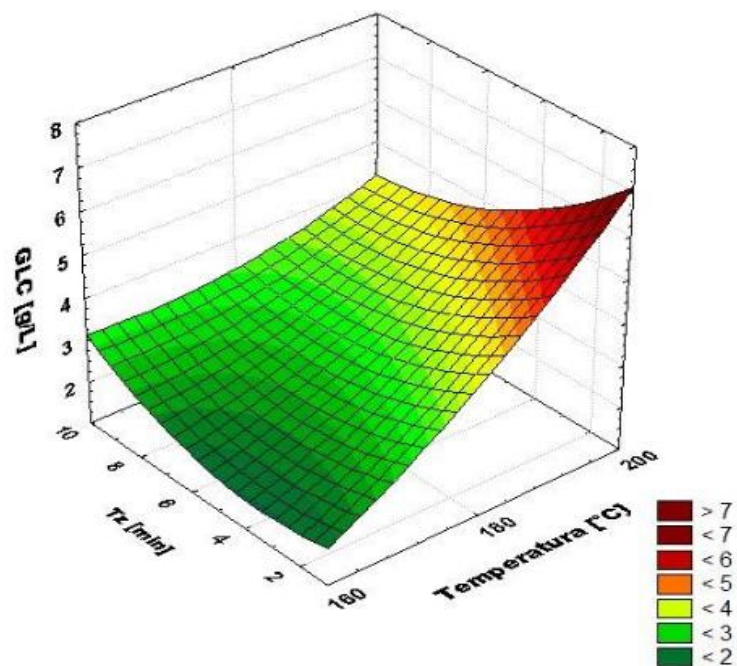
Iz rezultata sastava tekuće faze nakon kiselinske predobrade otpadne trave vidljivo je kako je koncentracija ksiloze veća od koncentracije glukoze i arabinoze za sve primijenjene uvjete predobrade. To je u skladu s literaturom gdje se navodi kako tijekom predobrade razrijeđenom kiselinom većinom dolazi do razgradnje hemicelulozne frakcije lignocelulozne sirovine budući da se hemiceluloza lakše hidrolizira od celuloze (Lenihan i sur., 2009; Zhang i Hu, 2014). Kao što se može vidjeti na Slici 14. koncentracija glukoze u tekućoj fazi hidrolizata nakon predobrade otpadne trave 0,5%-tnom sumpornom kiselinom kreće se u rasponu od 1,87 do 7,71 g L⁻¹. Koncentracija ksiloze (Slika 15.) u tekućem kiselinskom hidrolizatu bila je znatno veća od koncentracije glukoze, u rasponu od 4,62-21,31 g L⁻¹, dok se koncentracija arabinoze (Slika 16.) kretala u rasponu od 2,23-5,00 g L⁻¹. Arabinoza se pri povišenim temperaturama razgrađuje puno brže nego ksiloza stoga su konačni udjeli arabinana nakon provedene kiselinske hidrolize puno manji u odnosu na udjele glukana i ksilana (Hu i sur., 2008). Sve minimalne koncentracije šećera postignute su pri temperaturi od 160 °C i vremenu zadržavanja od 5 minuta dok su sve maksimalne koncentracije postignute pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 1 minute nakon čega daljnjim zadržavanjem u reaktoru dolazi do razgradnje šećera odnosno smanjenja njihovih koncentracija. Također gledajući samo utjecaj temperature pri istom vremenu zadržavanja kod tekućeg hidrolizata možemo vidjeti trend porasta koncentracije glukoze sa povećanjem temperature što je u skladu s literaturom gdje je zabilježeno kako više temperature tijekom kiselinske hidrolize pogoduju hidrolizi celuloze (Saha i sur., 2002; Sun i Cheng, 2001).

Sa Slike 13. vidljivo je kako s porastom temperature dolazi do porasta koncentracije furana koji se kreću u rasponu između 28,95 i 2046,05 mg L⁻¹ pri čemu je maksimalna koncentracija postignuta pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 1 minute. Zamijećeni trendovi u promjeni koncentracije šećera inhibitora u skladu su s literaturom gdje se navodi kako je temperatura ključni faktor koji utječe na degradaciju šećera u inhibitore, te

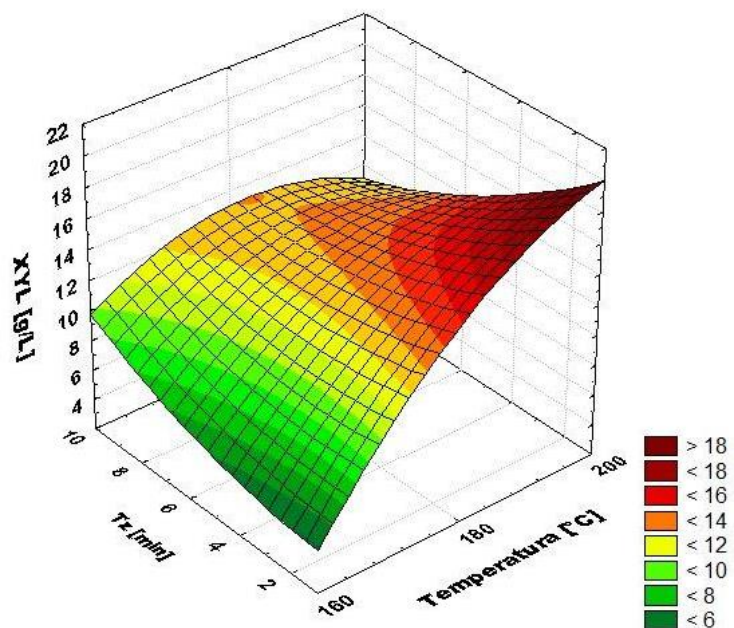
više primjenjene temperature rezultiraju većim koncentracijama inhibitora (Chandel i sur., 2012). Dehidracijom iz pentoza nastaje hidrosimetilfurfural (HMF), a iz heksoza furfural (Lenihan i sur. 2009).



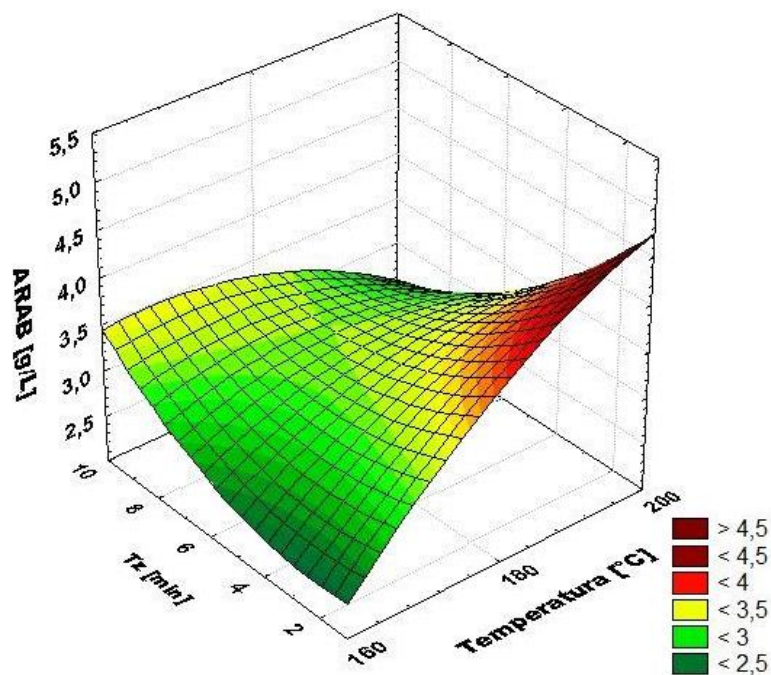
Slika 13. Koncentracija furana u tekućoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.



Slika 14. Koncentracija glukoze u tekućoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.

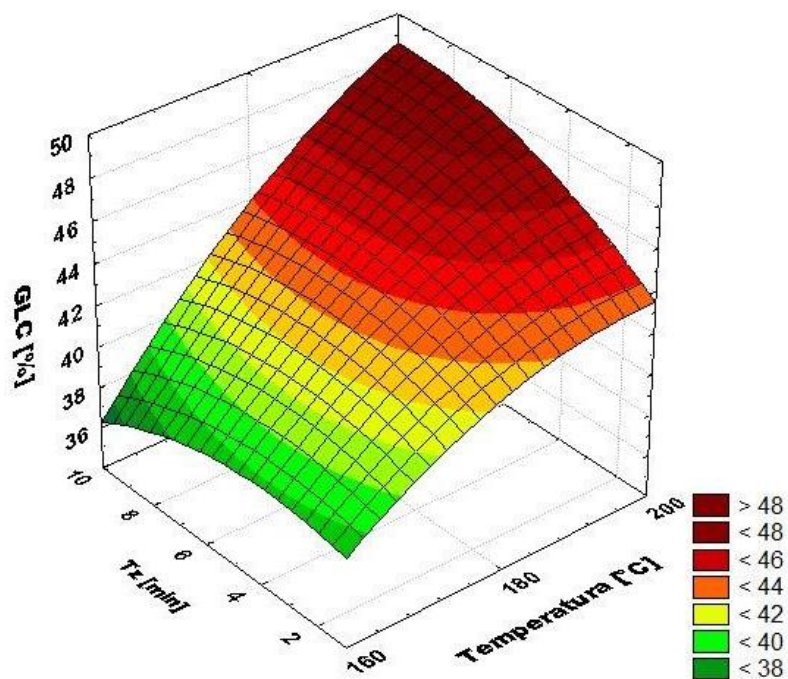


Slika 15. Koncentracija ksiloze u tekućoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.

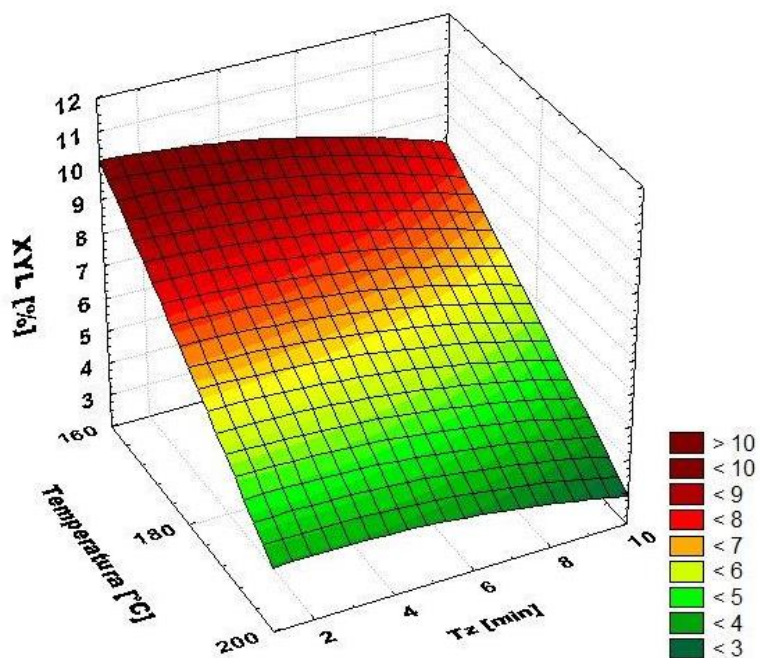


Slika 16. Koncentracija arabinoze u tekućoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.

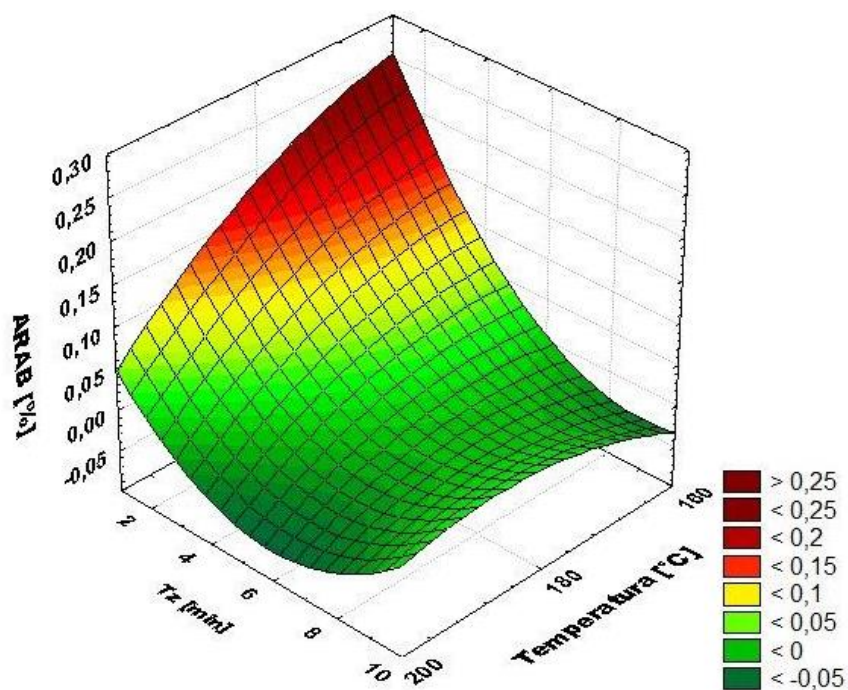
Za razliku od koncentracije glukoze u tekućem kiselinskom hidrolizatu, koncentracija glukoze u krutom hidrolizatu je znatno manja i kreće se od 1,48-1,94 g L⁻¹, odnosno sa Slike 17. možemo vidjeti da sastav krute faze iznosi između 36,98 i 49,19 % glukana, gdje je maksimalna koncentracija glukoze postignuta na $t_z=5$ i 10 minuta pri temperaturi od 200 °C. Razina ksiloze u krutom hidrolizatu je također niža od one u tekućem i kreće se između 0,12 i 0,44 g L⁻¹, prikazano na Slici 18. kao udio od 2,87 do 10,78 % ksilana u krutoj fazi. Koncentracije arabinoze detektirane u krutoj fazi kiselinskog hidrolizata su jako niske i iznose 0,01 g L⁻¹ pri temperaturama od 160 i 180°C za vrijeme zadržavanja od 1 minute, dok su pri ostalim ekperimentima koncentracije bile ispod praga detekcije što možemo vidjeti na Slici 19. koja prikazuje da je udio arabinana u krutoj fazi između 0 i 0,26 % . To je u skladu s literaturom gdje se navodi da pri predtretmanu otpadne trave s razrijeđenom sumpornom kiselinom može nastati do 1,78 % arabinana (Chen i sur., 2007). Lignin netopiv u kiselini (LNTK) i pepeo određeni su u čvrstoj fazi te je određen njihov zajednički udio koji se kreće u rasponu od 26,21 % do 34,54 % (Slika 20.). Najveći udio LNTK u iznosu od 34,54 % određen je pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 10 min. Udio lignina topivog u kiselini (LTK) podjednak je za sve uvjete predobrade i kreće se u rasponu od 0,20 % do 2,51 % te je zanemariv.



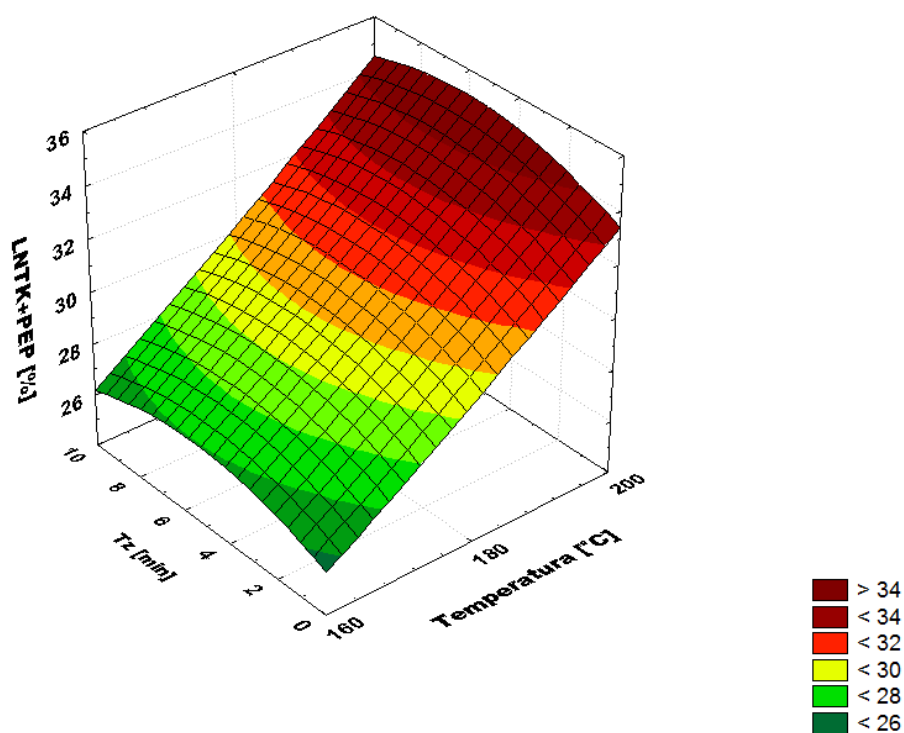
Slika 17. Udio glukoze u krutoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.



Slika 18. Udio ksiloze u krutoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.

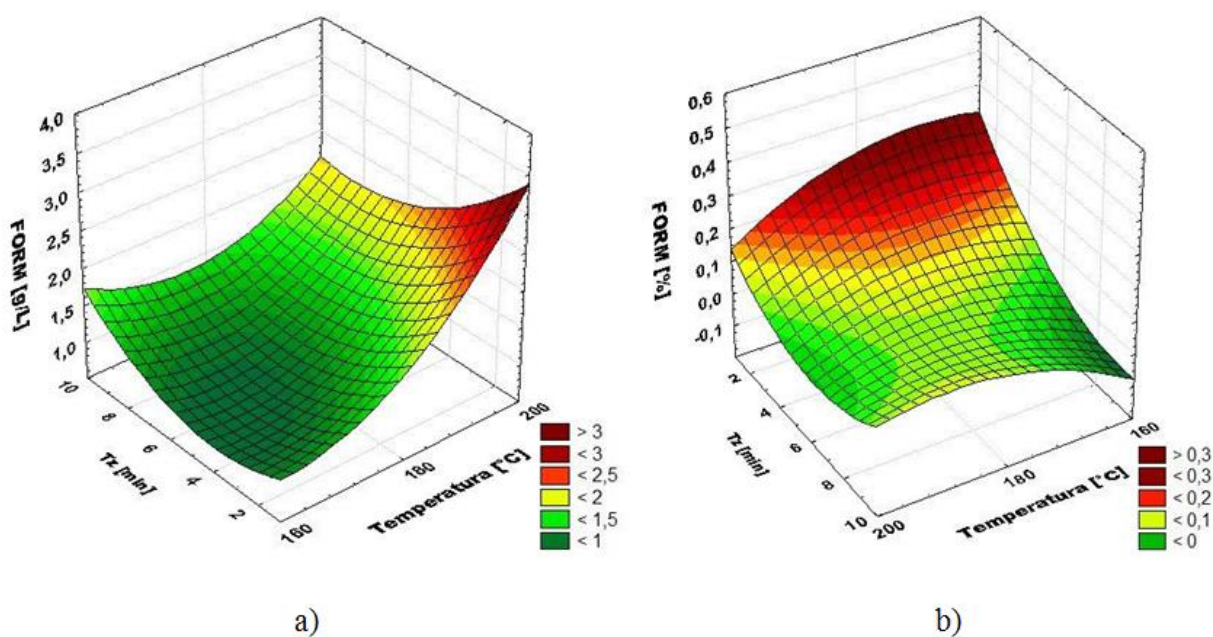


Slika 19. Udio arabinoze u krutoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.

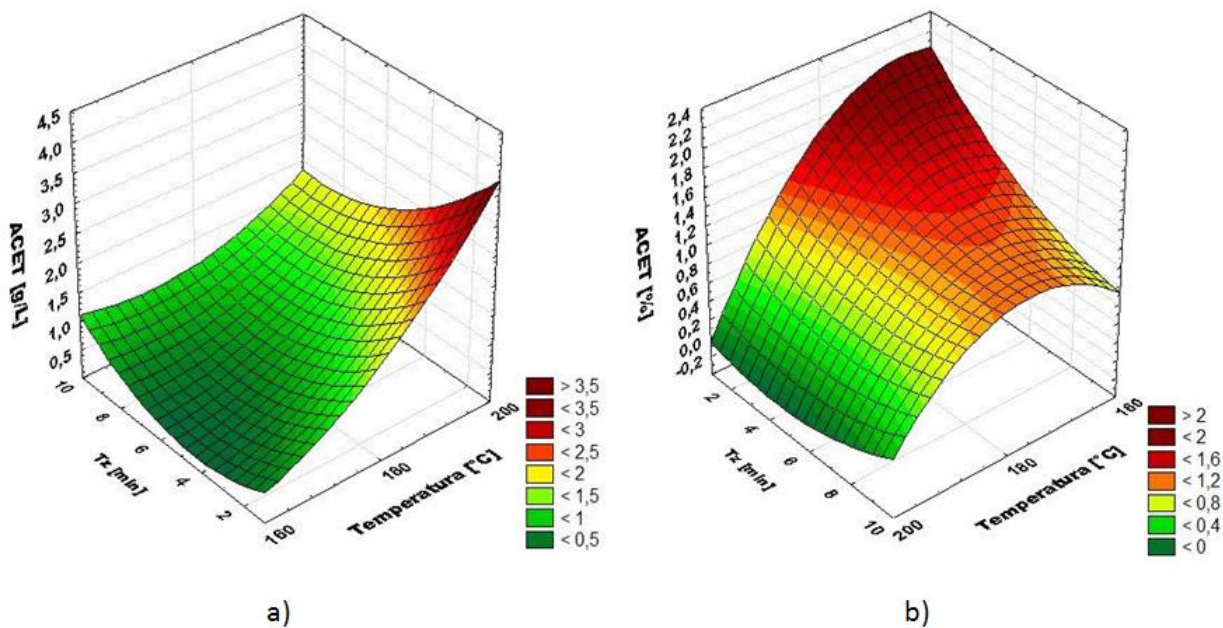


Slika 20. Udio lignina netopivog u kiselini i pepela u krutoj fazi hidrolizata nakon nakon predtretmana otpadne trave s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.

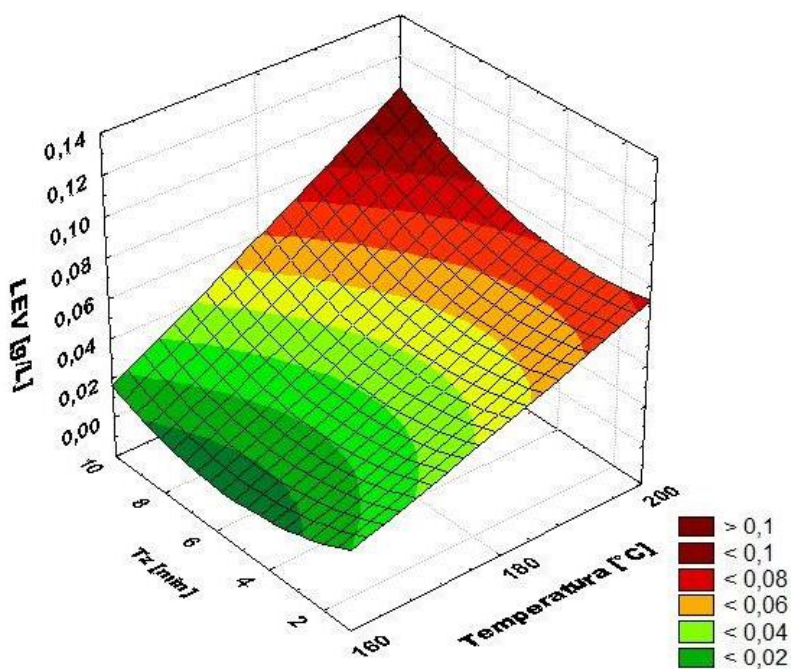
Osim monosaharida, u tekućoj fazi nakon predtretmana kiselinom određene su i koncentracije mravlje, octene i levulinske kiseline koje su se kretale u rasponima od 0,94-3,72 g L⁻¹ za mravlju, 0,45-4,26 g L⁻¹ te 0,02-0,68 g L⁻¹ za levulinsku kiselinu, što je prikazano na Slikama 21a, 22a i 23. Kao i kod šećera, maksimalne koncentracije kiselina u tekućem kiselinskom hidrolizatu su postignute pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 1 minute, dok su, minimalne koncentracije za mravlju i octenu postignute pri 160 °C i t_z=5 min, a za levulinsku pri 160 °C i t_z=1 min te pri 160 °C i t_z=10 min. U krutoj kiselinskoj fazi hidrolizata prisutnost mravlje kiseline (Slika 21b) nije detektirana u ispitivanim uvjetima osim pri vremenu zadržavanja od 1 minute na temperaturama od 160 i 180 °C gdje je koncentracija mravlje kiseline iznosila 0,01 odnosno 0,02 g L⁻¹. Koncentracije octene kiseline u krutoj fazi hidrolizata (Slika 22b), u odnosu na tekuću fazu, su znatno niže i kreću se između 0,02 i 0,08 g L⁻¹, pri čemu je maksimalna koncentracija kiseline postignuta pri uvjetima temperature 160 °C i vremenu zadržavanja od 1 minute. Levulinska kiselina u krutoj fazi hidrolizata nakon predtretmana s kiselinom nije detektirana.



Slika 21. Koncentracija formijatne (mravlje) kiseline u: a) tekućoj fazi i b) krutoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.



Slika 22. Koncentracija acetatne (octene) kiseline u: a) tekućoj fazi i b) krutoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.

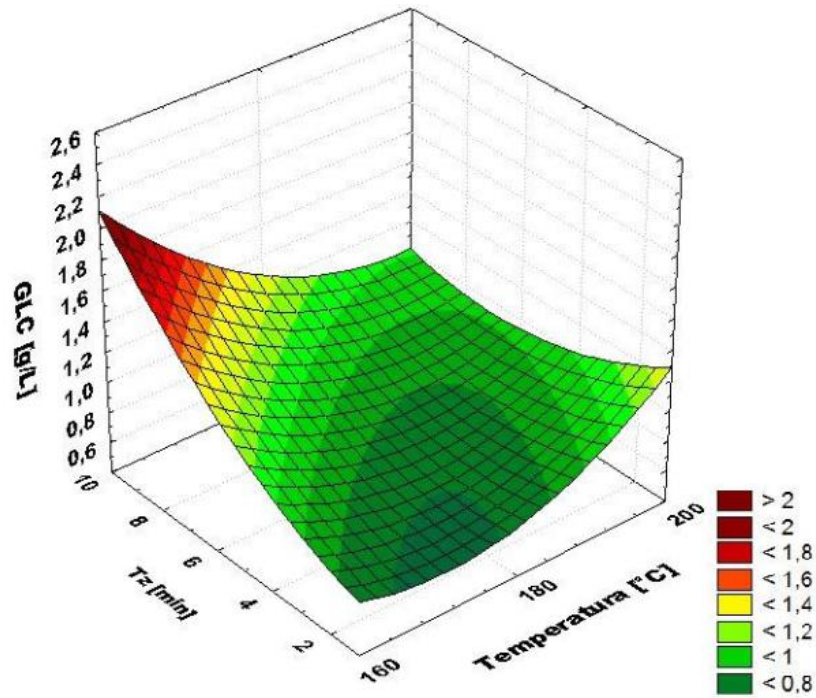


Slika 23. Koncentracija levulinske kiseline u tekućoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.

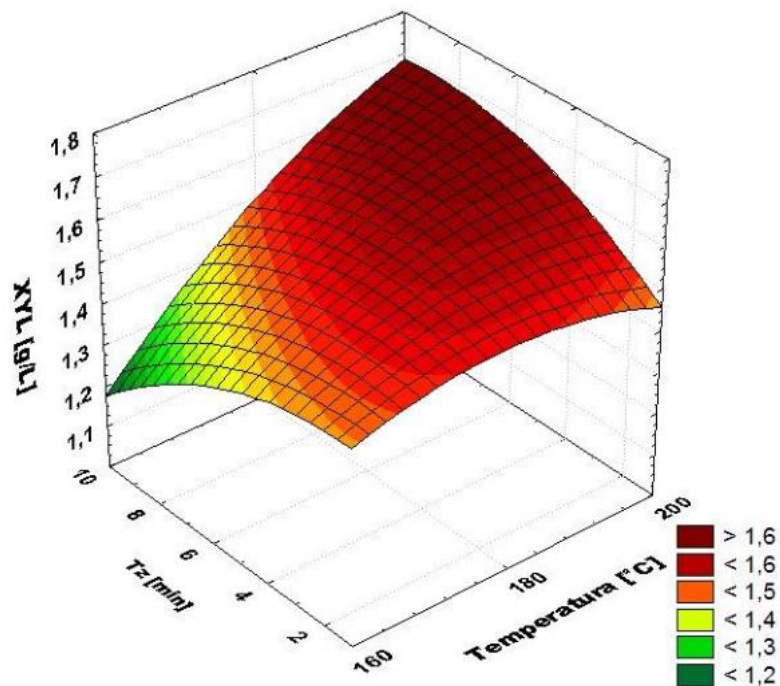
4.2. Alkalna hidroliza otpadne trave u visokotlačnom reaktoru

U ovom poglavlju izneseni su rezultati dobiveni nakon provedenog predtretmana otpadne trave sa 1%-tnom natrijevom lužinom u visokotlačnom reaktoru. Analizom tekuće i čvrste faze lužnatog hidrolizata određene su koncentracije šećera glukoze, ksiloze i arabinoze, te koncentracije octene, mravlje i levulinske kiseline te ukupnih furana.

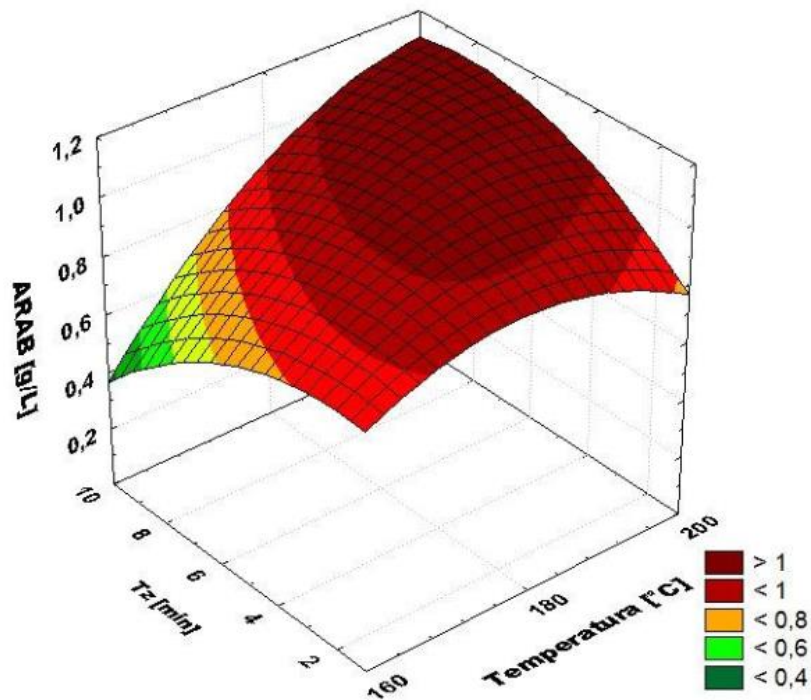
Na Slici 24. može se vidjeti da je koncentracija glukoze u tekućoj fazi hidrolizata nakon predobrade otpadne trave 1%-tnom natrijevom lužinom u rasponu od 0,39-1,18 g L⁻¹, te da povećanjem vremena zadržavanja otpadne trave u reaktoru (1, 5 i 10 min) javlja trend porasta koncentracije šećera glukoze na svakoj pojedinoj temperaturi (160, 180 i 200 °C). Najviša koncentracija glukoze u ovom hidrolizatu ostvarena je pri $t_z = 10$ minuta i temperaturi od 160 °C i iznosi 1,18 g L⁻¹. Koncentracije ksiloze (Slika 25.) u tekućem lužnatom hidrolizatu su nešto veće u odnosu na koncentracije glukoze i kreću se u rasponu od 0,53-0,83 g L⁻¹. Minimalna koncentracija ksiloze dobivena je pretretmanom pri 160 °C i $t_z = 10$ min, dok je maksimalna koncentracija ksiloze dobivena predtretmanom pri 180 °C i $t_z = 10$ min. Veći udjeli ksilana u odnosu na udjele glukana u tekućem dijelu hidrolizata mogu se objasniti strukturom hemiceluloze. Hemiceluloza je heteropolimer ugljikohidrata koji se sastoji od 5-C šećera (ksiloza, arabinoza) i 6-C šećera (manozna, glukoza, galaktoza). Struktura hemiceluloze je amorfna i razgranata što je razlog lakše razgradnje hemiceluloze u odnosu na celulozu (Satimanont i sur., 2012). Sa Slike 25. možemo vidjeti da se koncentracija ksiloze na svakoj pojedinoj temperaturi povećava sa povećanjem vremena zadržavanja osim kod temperature od 160 °C gdje prelaskom sa $t_z = 1$ min na $t_z = 5$ min koncentracija raste, te se zatim prelaskom na $t_z = 10$ min koncentracija smanjuje i iznosi 0,53 g L⁻¹. Isti trend povećanja odnosno smanjenja koncentracije (pri temperaturi od 160 °C) uočavamo i kod arabinoze. Koncentracije šećera arabinoze (Slika 26.) u tekućem lužnatom hidrolizatu kretale su se između 0,11 i 0,54 g L⁻¹, pri čemu je, kao kod ksiloze, minimalna koncentracija šećera postignuta pri 160 °C i $t_z = 10$ min, a maksimalna pri 180 °C i $t_z = 10$ min, iz čega možemo vidjeti da su temperatura od 180 °C i vrijeme zadržavanja od 10 min najpovoljniji uvjeti za razgradnju hemiceluloze tj. dobivanje pentoznih šećera. Koncentracije furana (Slika 27.) određenih u tekućoj fazi hidrolizata kreću se između 34,21 i 247,37 mg L⁻¹ gdje maksimalna koncentracija određena pri najekstremnijim uvjetima odnosno temperaturi od 200 °C i $t_z = 10$.



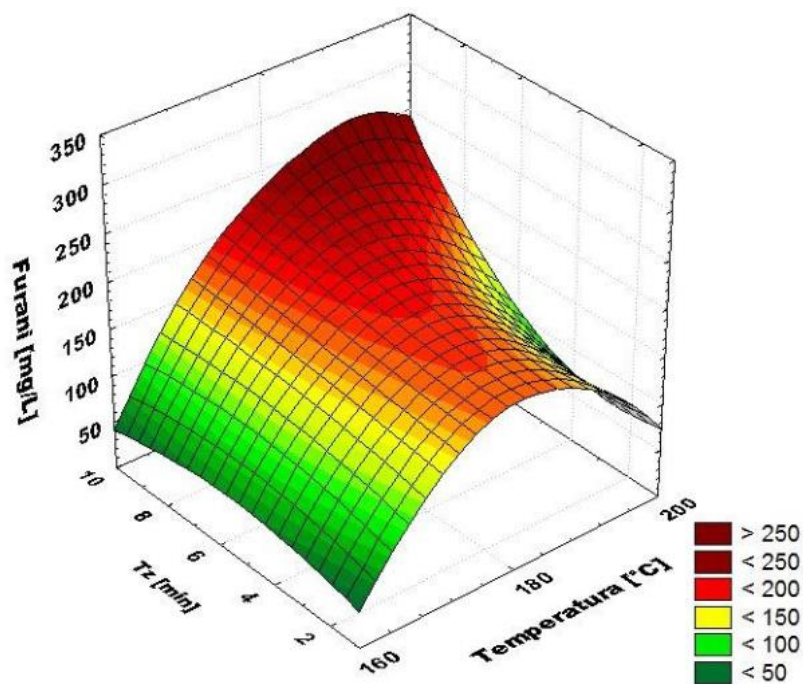
Slika 24. Koncentracija glukoze u tekućoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 1%-tnom natrijevom lužinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.



Slika 25. Koncentracija ksiloze u tekućoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 1%-tnom natrijevom lužinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.

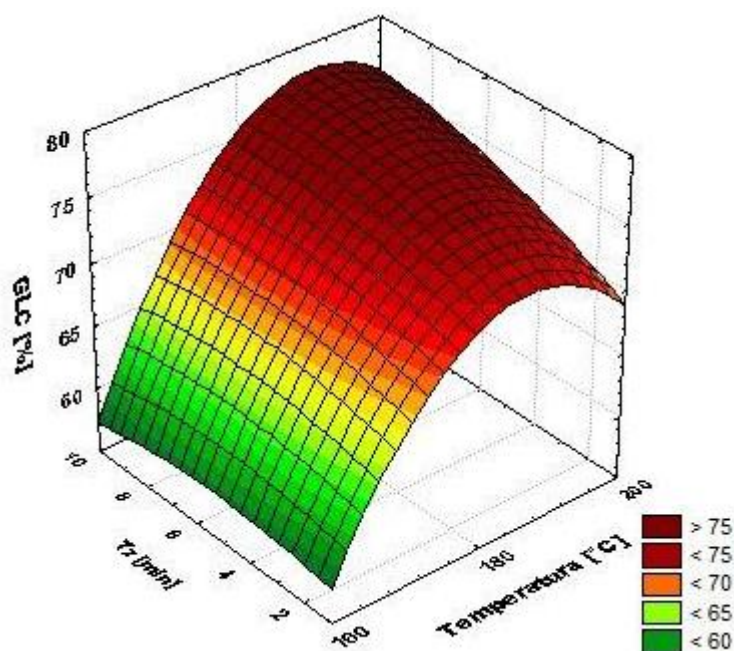


Slika 26. Koncentracija arabinoze u tekućoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 1%-tnom natrijevom lužinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.

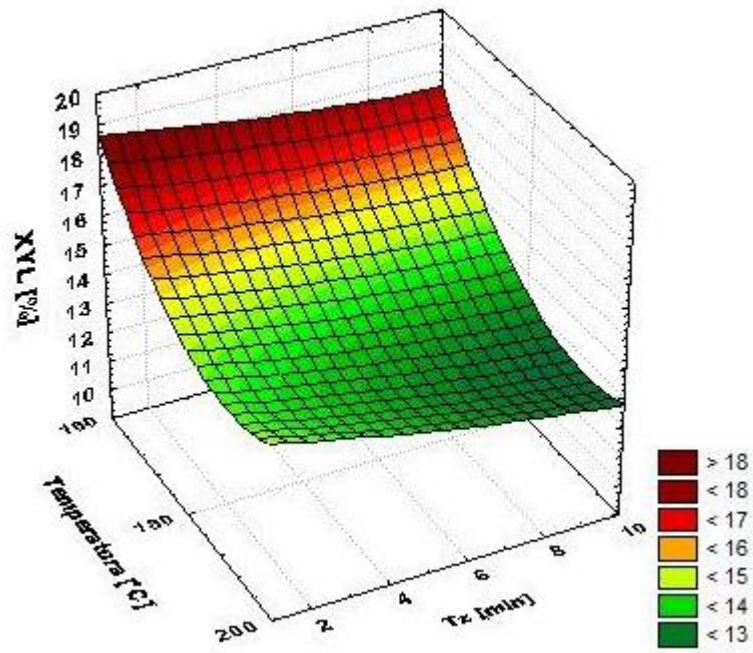


Slika 27. Koncentracija furana u tekućoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 1%-tnom natrijevom lužinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.

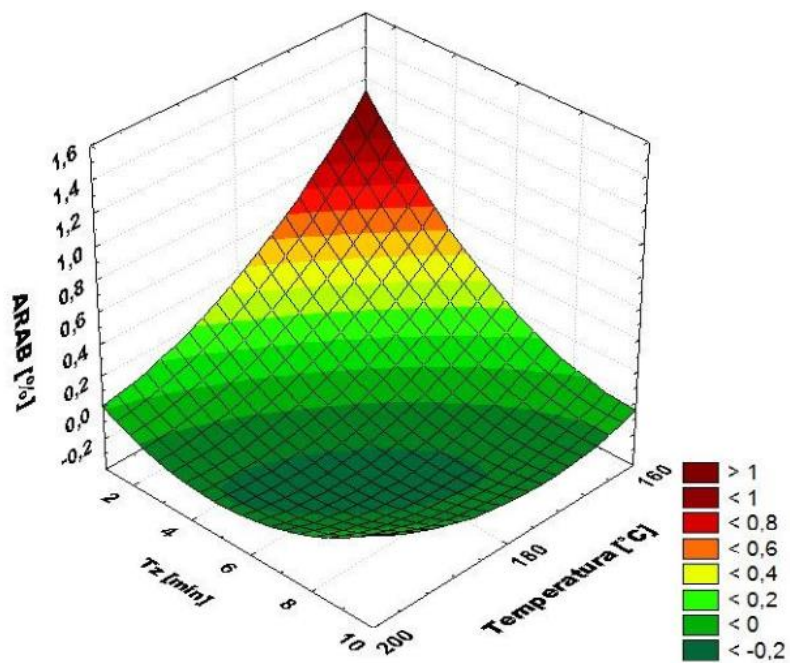
U krutoj fazi lužnatog hidrolizata koncentracije glukoze su nešto većih vrijednosti nego što su kod tekućeg lužnatog hidrolizata i kreću se u rasponu od 1,54-3,71 g L⁻¹, što bi gledano kao udjel glukoze u krutoj fazi iznosilo između 57,08 % i 75,81 % (Slika 28.) pri čemu je maksimalna koncentracija glukoze postignuta pri najvišoj temperaturi (200 °C) i najduljem vremenu zadržavanja (10 minuta). Gledajući pojedino svaku temperaturu, povećanjem vremena zadržavanja dolazi do porasta koncentracije glukoze. Koncentracije šećera ksiloze u krutoj fazi su nešto niže od koncentracije iste u tekućem hidrolizatu i kreću se u rasponu od 0,30-0,65 g L⁻¹ odnosno između 12,88 i 18,40 % ksiloze u krutoj fazi lužnatog hidrolizata. Na Slici 29. može se vidjeti da se unutar svake temperature, mijenjanjem vremena zadržavanja koncentracija ksiloze mijenja samo za 0,01 g L⁻¹. Šećer arabinoza pojavljuje se samo pri najblažim uvjetima provođenja eksperimenta (T=160 °C, t_Z=1 min) i iznosi 1,72 % (Slika 30). Analizom krute faze određen je i udio lignina topivog u kiselini te iznosi između 1,63% i 2,86%. Također je određen i zajednički udjel lignina netopivog u kiselini i pepela (Slika 31.) u rasponu od 9,20% do 22,98% gdje je najveći udjel određen pri uvjetima temperature od 160 °C i vremenu zadržavanja od 10 minuta.



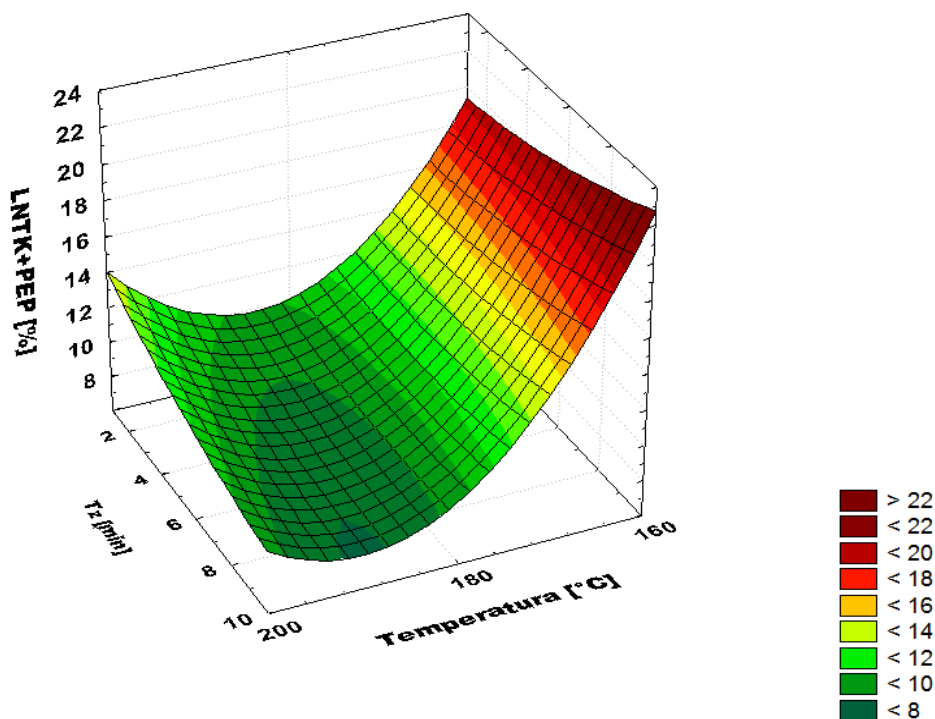
Slika 28. Udio glukoze u krutoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 1%-tnom natrijevom lužinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.



Slika 29. Udio ksiloze u krutoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 1%-tnom natrijevom lužinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.



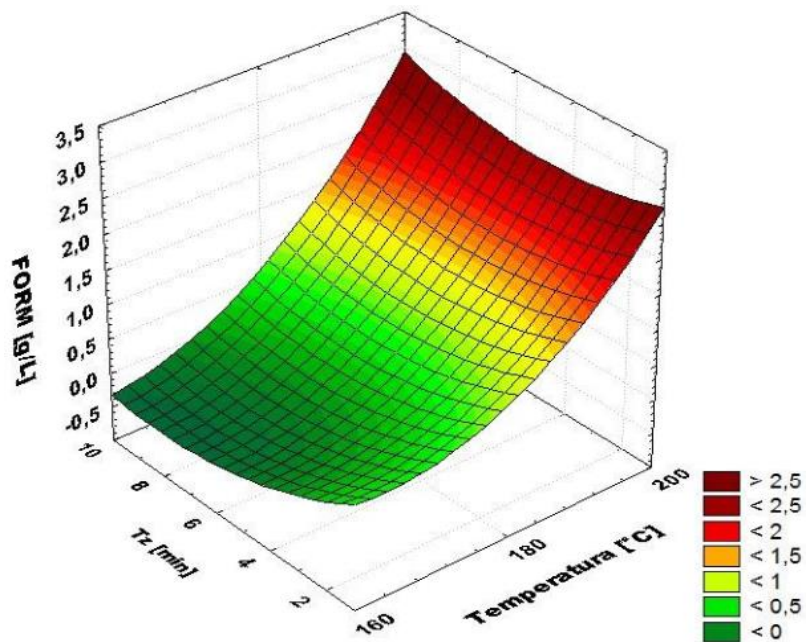
Slika 30. Udio arabinoze u krutoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 1%-tnom natrijevom lužinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.



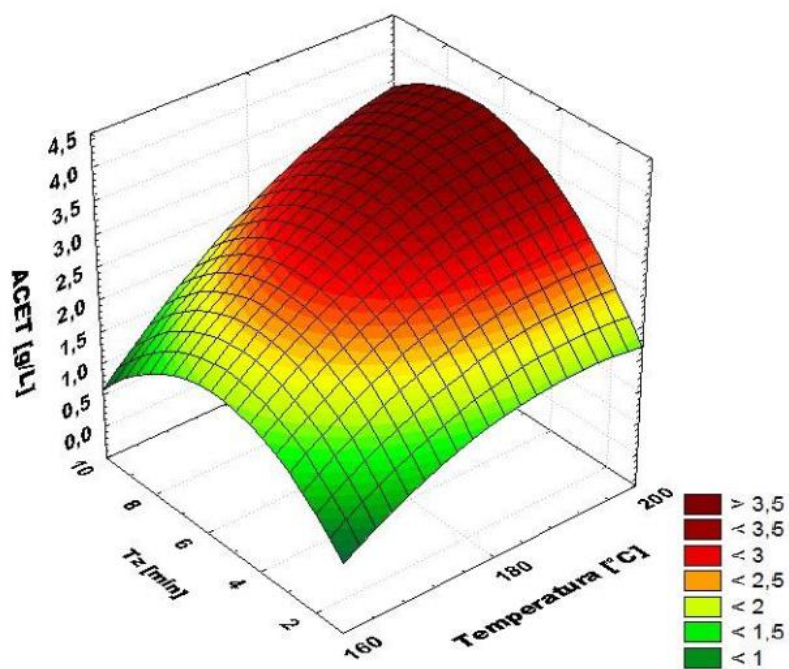
Slika 31. Udio lignina netopivog u kiselini i pepela u krutoj fazi hidrolizata nakon nakon predtretmana otpadne trave s 1%-tnom natrijevom lužinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.

Osim koncentracija šećera nakon predobrade otpadne trave lužinom određene su i koncentracije nusprodukata: mravlje, octene i levulinske kiseline. U tekućem hidrolizatu mravlja kiselina pojavljuje se pri 180 °C i $t_z=1$ min i iznosi 0,99 g L⁻¹, te pri sva tri vremena zadržavanja na temperaturi od 200 °C, gdje povećanjem vremena zadržavanja u reaktoru dolazi do povećanja koncentracije kiseline u rasponu od 1,09-1,61 g L⁻¹ (Slika 32.). Koncentracija octene kiseline u tekućem hidrolizatu (Slika 33.) varira između 0,02-1,72 g L⁻¹ gdje je maksimalna koncentracija, kao i kod mravlje kiseline, postignuta pri temperaturi od 200 °C i $t_z=10$ min. Porastom vremena zadržavanja na svakoj od temperatura dolazi do porasta koncentracije octene kiseline, osim kod temperature od 160 °C gdje pri $t_z=10$ min imamo koncentraciju od 0,02 g L⁻¹, koja poprilično odskače od ostalih izmjerenih koncentracija, te je moguće da je prilikom mjerenja i analitike samog eksperimenta pri tim uvjetima (T=160 °C, $t_z=10$ min) došlo do pogreške. Pri vremenu zadržavanja od 5 i 10 minuta na temperaturi od 200 °C došlo je do nastajanja levulinske kiseline (Slika 34.) koja nije detektirana pri nižim temperaturama, što objašnjavaju literaturni navodi kako ta kiselina nastaje u ekstremnim uvjetima visoke temperature ili dugog vremena zadržavanja razgradnjom HMF-a (Jönsson i

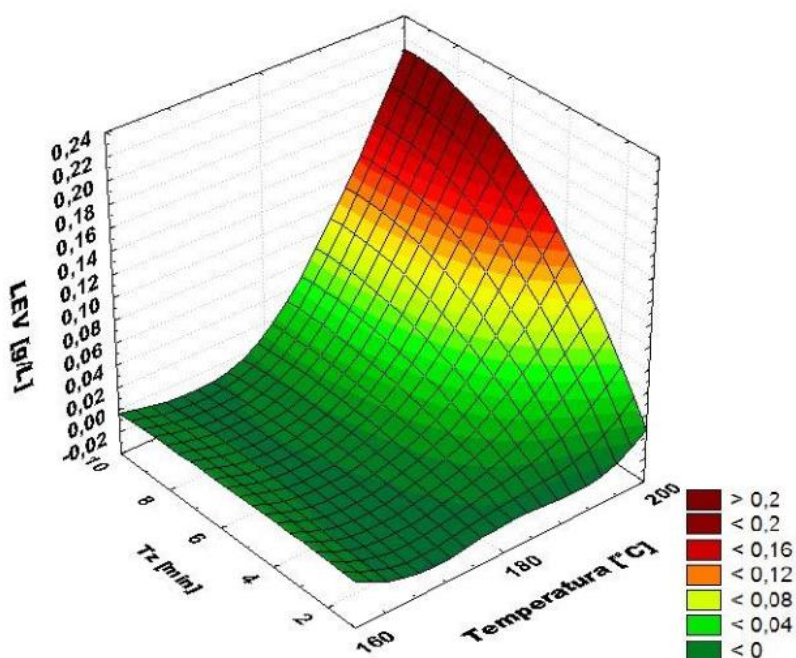
Martin, 2015). U krutoj fazi hidrolizata nakon predtretmana s 1%-tnom NaOH nije detektirana prisutnost nijedne od ispitivanih kiselina.



Slika 32. Koncentracija formijatne (mravlje) kiseline u tekućoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 1%-tnom natrijevom lužinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.



Slika 33. Koncentracija acetatne (octene) kiseline utekućoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 1%-tnom natrijevom lužinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja.



Slika 34. Koncentracija levulinske kiseline u tekućoj fazi hidrolizata nakon predtretmana otpadne trave s 1%-tnom natrijevom lužinom u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja

5. ZAKLJUČCI

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

1. Analizom je utvrđen sljedeći sastav otpadne trave: 30,14% glukana, 14,59% ksilana, 2,46% arabinana, 2,88% lignina topivog u kiselini, 28,94% lignina netopljivog u kiselini i pepela, 1,77% octene kiseline te 14,79% proteina.
2. Nakon kiselinske predobrade otpadne trave s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru u tekućoj fazi pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 1 minute dobiven je najveći udio fermentabilnih šećera. Najveća koncentracija glukoze iznosila je 7,71 g L⁻¹, najveća koncentracija arabinoze iznosila je 5,00 g L⁻¹ te je najveća koncentracija svih ispitivanih šećera bila upravo koncentracija ksiloze u iznosu od 21,31 g L⁻¹ zbog olakšane hidrolize hemiceluloze u odnosu na celulozu pri zadanim uvjetima. U čvrstoj fazi hidrolizata koncentracije monosaharida bile su znatno manje u odnosu na tekuću fazu, a maksimalna određena koncentracija u iznosu od 1,94 g L⁻¹ bila je glukoza pri temperaturi od 200 °C i vremenima zadržavanja $t_z=5$ min i $t_z=10$ minuta.
3. Nakon kiselinske predobrade otpadne trave sa 0,5%-tnom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru u tekućoj fazi hidrolizata pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 1 minute određene su maksimalne koncentracije svih nusprodukata: mravlje kiseline u iznosu od 3,72 g L⁻¹, octene kiseline u iznosu od 4,26 g L⁻¹, levulinske kiseline u iznosu od 0,68 g L⁻¹ te furana u iznosu od 2046,05 mg L⁻¹. U krutoj fazi hidrolizata koncentracije svih promatranih kiselina bile su ispod praga detekcije, odnosno zanemarivo male.
4. Nakon lužnate predobrade otpadne trave sa 1%-tnom natrijevom lužinom u visokotlačnom reaktoru u tekućoj fazi hidrolizata najveća koncentracija fermentabilnog šećera bila je koncentracija glukoze u iznosu od 1,18 g L⁻¹ zabilježena na temperaturi od 160 °C i vremenu zadržavanja od 10 minuta. Najveća koncentracija ksiloze od 0,83 g L⁻¹ određena je pri temperaturi od 180°C i $t_z=10$ min, a najveća koncentracija arabinoze od 0,54 g L⁻¹ zabilježena je pri vremenu zadržavanja od 10 minuta na temperaturama 180 °C i 200 °C. U čvrstoj fazi hidrolizata najveća koncentracija glukoze zabilježena je na temperaturi od 200 °C i $t_z=10$ minuta te je iznosila 3,71 g L⁻¹ maksimalna koncentracija ksiloze od 0,65 g L⁻¹ postignuta je pri temperaturi od 200 °C i vremenima zadržavanja od 1 i 5 minuta, a pojava šećera arabinoze u krutoj fazi

hidrolizata zabilježena je samo kod vremena zadržavanja od 1 minute pri temperaturi od 160 °C te je iznosila 0,05 g L⁻¹.

5. Nakon lužnate predobrade otpadne trave sa 1%-tnom natrijevom lužinom u visokotlačnom reaktoru u tekućoj fazi hidrolizata pri temperaturi od 200 °C i vremenu zadržavanja od 10 minute određene su maksimalne koncentracije svih nusprodukata: mravlje kiseline od 1,61 g L⁻¹, octene kiseline od 1,72 g L⁻¹, levulinske kiseline od 0,21 g L⁻¹ te furana u iznosu od 247,37 mg L⁻¹. U krutoj fazi hidrolizata koncentracije svih analiziranih kiselina bile su ispod praga detekcije.
6. Na osnovi rezultata ovog istraživanja jasno je da je potrebno provesti daljnju optimizaciju procesa predobrade otpadne trave s ciljem dobivanja većeg udjela fermentabilnih šećera i manjeg udjela nusprodukata.

6. LITERATURA

Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D. B. (2011) Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnolog advances*. **29**, 675-685.

Alriksson, B. (2006) Ethanol from lignocellulose: Alkali detoxification of dilute-acid spruce hydrolysates. Dissertation for the degree of Doctor of Science in Technology, Karlstad University Studies.

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M. J. (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresource Technol.* **101**, 4851–4861.

Anonymous 1 (2008) Struktura hemiceluloze, <<https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/prehrambena-vlakna>>. Pristupljeno 2 srpnja 2019.

Anonymous 2 Piroлиза, <<https://www.britannica.com/science/pyrolysis>>. Pristupljeno 20 srpnja 2019.

Anonymous 3 (2018) Bioplinsko postrojenje <<http://www.lee.lu/index.php/en/>>. Pristupljeno 24 srpnja 2019.

Bačinić, A. (2016) Ekstrakcija i karakterizacija lignina i celuloze iz biljke *Miscanthus x giganteus*. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Bajpai, P. (2016) Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, U: Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production (Bajpai, P., ured.) Springer, Singapur, str.17-57.

Barrett, D. M., Delwiche, M. J., Kumar, P., Stroeve, P. (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *IndEngChemRes.* **48(8)**, 3713 – 3729.

Bensah, E. C., Mensah, M. (2013) Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: Technologies and innovations, *IntJChemEng.* **2013**, 1-21.

Bishnu, J., Bhatt, M. R., Joshi, J., Malla, R., Sreerama, L. (2011) Lignocellulosic ethanol production: Current practices. *Biotechnol. Mol. Bio. Rev.* **6(8)**, 172-182.

- Bussemaker, M. J., Zhang, D. (2013) Effect of Ultrasound on Lignocellulosic Biomass as a Pretreatment for Biorefinery and Biofuel Applications. *IndEngChem Res.* **52(10)**, 3563–3580.
- Car, A. (2015) Proizvodnja bioetanola na obnovljivim sirovinama. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Chandel, A.K., Felipe, A.F., Vaz de Arruda, P.A., Milessi, T.S.S., da Silvia, S.S., Gracas, M. (2012) Dilute Acid Hydrolysis of Agro-Residues for the Depolymerization of Hemicellulose: State of Art: U: D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization, (da Silva, S.S., Chandel. A.K., ured.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str. 39-61.
- Chen, Y. C., Sharma-Shivappa, R. R., Keshwani, D., Chen, C. (2007) Potential of Agricultural Residues and Hay for Bioethanol Production. *Appl. Biochem. Biotech.* **142 (3)**, 90-276.
- Chen, Y., Stevens, M. A., Zhu, Y., Holmes, J., Xu, H. (2013) Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnol. Biofuels.* **6**, 8-10.
- Cheng, K., Liu, D., Zhao, X. (2009) Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 815–827.
- Cunha, J. T., Costa, C. E., Ferraz, L., Romani, A., Johansson, B., Sa-Correia, I., Domingues, L. (2018) HAA1 and PRS3 over expression boosts yeast tolerance towards acetic acid improving xylose or glucose consumption: unravelling the underlying mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102(10)**, 4589–4600.
- Demirbas, A. (2008) Heavy metal adsorption on agro-based waste materials: a review. *J. Hazard. Mater.* **157**, 220-229.
- Eggeman i Elander (2005) Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* **96 (18)**, 2019-25.
- Galbe, M., Zacchi, G. (2007) Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* **108**, 41-65.
- Gámez S., González-Cabriaes J. J., Ramírez, J. A., Garrote, G., Vázquez, M. (2006) Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *J. Food Eng.* **74 (1)**, 78–88.

- Govedarica, D. (2016) Predobrada kukuruznih oklasaka za proizvodnju bioetanola. Završni rad, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Han, M., Moon, S., Kim, Y. (2009) Bioethanol production from ammonia percolated wheat straw. *Biotechnol. Bioproc.* **14**, 606-11
- Harmsen, P. F. H., Huijgen, W. J.J., Bermudez Lopez, L. M., Bakker, R. R. C. (2010) Literature Review of Physical Chemical Pretreatment Process for Lignocellulosic Biomass, Food&Bio based research, Biosynergy, Energy research Centre of the Netherland.
- Harmsen, P., Lips, S., Bakker, R. (2013) Pretreatment of lignocellulose for biotechnological production of lactic acid. Research review Wageningen UR Food&Biobased Research, Wageningen, The Netherlands.
- Hassan, S. S., Williams, G. A., Jaiswal, A. K. (2018) Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **262**, 310–318.
- Hendricks, A. T., Zeeman, G. (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **100**, 8-10.
- Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, R. L., Howars, S. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bio conversion and enzyma production. *Afr. J. Biotechnol.* **12**, 602-619.
- Hu, R., Lin, L., Liu, T., Liu, S. (2010) Dilute sulfuric acid hydrolysis afsugarma plewood extract at atmospheric pressure. *Bioresour. Tehnol.* **101**, 3586-3594.
- Hu, Z., Wang, Y., Wen, Z. (2008) Alkali (NaOH) pretreatment of switchgrass by radio frequency based dielectric heating. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **148** (1-3), 71-81.
- Ivančić – Šantek, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek, B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kem. Ind.* **65**, 25-38.
- Jiang, T., Qiao, H., Zheng, Z., Chu, Q., Li, X., Yong, Q., Ouyang, J. (2016) Lactic acid production from pretreated hydrolysates of corn stover by a newly developed *Bacillus coagulans* strain. *PLOS ONE*. (objavljeno online 10. veljače 2016.). doi:10.1371/journal.pone.0149101

- Jonsson, L. J., Martin, C. (2015) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource. Tehnol.* **199**, 103-112.
- Jørgensen, H., Kristensen, J. B., Felby, C. (2007) Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenge and opportunities. *Biofuels. Bioprod. Bioref.* **1**, 119–134.
- Karimi, K., Taherzadeh, M. J. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A Review, *Int. J. Mol. Sci.* **9**, 1621–1651.
- Kim, S., Dale, B. E. (2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues, *Biomass Bio-energ.* **26**, 361–375.
- Kobayashi, H., Fukuoka, A. (2013) Synthesis and utilisation of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass. *Green Chem.* **12**(9), 1481-1676.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., Stroeve, P. (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **48** (8), 3713-3729.
- Laine, C. (2005) Structures of hemicelluloses and pectin in wood and pulp. Dissertation for the degree of Doctor of Science in Technology, Helsinki University of Technology
- Larsson, S., Quintana-Sainz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N. O., Jonsson, L.J. (2000) Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84–86**, 617–632.
- Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill, E., Ahmad, M. N. M., Rooney, D. W., Walker, G. M. (2010) Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *ChemEngJ.* **156**, 395–403.
- Liu, C. F., Sun, R.C. (2010) *Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels*, Elsevier. doi: [10.1016/C2009-0-06759-2](https://doi.org/10.1016/C2009-0-06759-2)
- Lopez, M. J., Vargas-Garcia, M. D., Suarez-Estrella F., Nichols, N. N., Dien, B. S., Moreno J. (2007) Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme. Microb. Technol.* **40**, 794–800.

- Mardetko, N., Novak, M., Trontel, A., Grubišić, M., Galić, M., Šantek, B. (2018) Bioethanol production from dilute-acid pre-treated wheat straw liquor hydrolysisate by genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem.Biochem.Eng.Q.* **32** (4), 483-499.
- Marić, V. (2000) *Biotehnologija i sirovine*. Zagreb: Stručna i poslovna knjiga d.o.o.
- Mason, T. J., Lorimer, J. P. (2002) *Applied sonochemistry: Uses of power ultrasound in chemistry and processing*, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.KGaA, Weinheim.
- Mattioli, A., Boscaro, D., DallaVenezia, F., Correale Santacroce, F., Pezzuolo, A., Sartori, L., Bolzonella, D. (2017) Biogas from residual grass: a territorial approach for sustainable bioenergy production. *WasteBiomassValori.* **8**, 2747-2756.
- Mohan, D., Pittman, C. U., Steele P. H. (2006) Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. *EnergyFuels* **20**, 848–889.
- Morrow, W. R., Griffin, W. M., Matthews, H. S. (2006) Modeling switchgrass derived cellulosic ethanol distribution in the United States. *Environ. Sci. Technol.* **40** (9), 2877–2886.
- Mussatto, S. I., Teixeira, J. A. (2010) Lignocellulose as raw material in fermentation processes. In: *Current Research, Technology and Education Topic sin Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, (A. Mendez-Vilas, ed.), Formatex, Spain, 897–907.
- Nigam S., P., Pandey, A. (2009) Utilisation of solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. U: *Biotechnology for agro-industrial residues*. (Singh-Nee Nigam, P., Pandey, A., ured.), 197-221.
- Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N. Q., Hahn-Hagerdal, B. (1999) Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and phydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 46–55
- Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates inhibition and detoxification. *Biores. Technol.* **74**, 17-24.
- Palonen, H. (2004) Role of ligninin the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Dissertation for the degree of doctor of technology VTT Technical Research Centre Of Finland.
- Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S. C., Dussap, C-G., Gnansounou, E. (2011) *Biofuels Alternative Feedstocks and Conversion Processes*. Elsevier Inc, Amsterdam

- Perez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martinez J. (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* **5**, 53–63.
- Perez-Pimienta, J.A., Lopez-Ortega, M.G., Varanasi, P. (2013) Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass. *Biores. Technol.* **127**, 18–24.
- Philippoussis, A. N. (2009) Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. U: *Biotechnology for agro-industrial residues.* (Singh-Nee Nigam, P., Pandey, A., ured.), 164-187.
- Predojević, Z. (2010) Postupci pripreme lignocelulozne sirovine za dobijanje etanola. Stručni rad, Tehnološki fakultet Sveučilišta u Novom Sadu
- Ragauskas, A. J. (2014) *Materials for biofuels*, Hackensack, New Jersey, str. 81-84.
- Rezić, T. (2012) *Industrijska biotehnologija, Biotehnoška Proizvodnja Biogoriva.* Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb
- Romero, I., Moya, M., Sánchez, S., Ruiz, E., Castro, E., Bravo, V. (2007) Ethanol fermentation of phosphoric acid hydrolysates from olive tree pruning, *IndCropProd.* **2 (2)**, 160–168.
- 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.
- San Miguel, G., Makibar, J., Fernandez-Akarregi, A.R. (2011) Conversion of wood into liquid fuels: a review of the science and technology behind the fast pyrolysis of biomass. U: *Biomass Crops: Production, Energy and the Environment.* (Alfred P. Haggerty, ured.) 1-88.
- Sánchez, O., Cardona, A. C. (2008) Trend in biotechnological production of fuel ethanol from different feed stocks. *Bioresour. Technol.* **99**, 5270–5295.
- Saritha M., Arora A. (2012) Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. *Indian J Microbiol.* **52**, 122-130.

- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., Aikat, K. (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew Energ.* **37**(1), 19-27.
- Satimanont, S., Luengnaruemitchai, A., Wongkasemjit, S. (2012) Effect of Temperature and Time of Dilute Acid Pretreatment of Corn Cobs. *IntJChemBiolEng.* **6**, 333-337.
- Sederoff, R. R., McKay, J. J., Ralph, J., Hatfield R. D. (1999) Unexpected variation in lignin, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 145-152.
- Silversteina, R. A., Chena, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Boyette, M. D., Osborne J. (2008) A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Biores. Technol.* **98**, 3000-3011.
- Sun, Y., Cheng, J. (2001) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* **83**, 1-11.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.* **83**, 1–11.
- Taherzadeh, M., Karimi, K., (2007) Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources.* **2**, 472-499.
- Takacs, E., Wojnarovits, L., Foldavary, C., Hargagittai, P., Borsa, J., Sajo, I. (2000) Effect of combined gamma-irradiation and alkali treatment on cotton-cellulose. *Phys. Chem.* **57**, 339-340.
- Teghammar, A., Karimi, K., Sarvari Horvath, I., Taherzadeh, M. J. (2012) Enhanced biogas production from rice straw, triticale straw and soft wood spruce by NMMO pretreatment. *Biomass. Bioenerg.* **36**, 20-116.
- Tengerdy, R. P., Szakacs, G. (2003) Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13** (2-3), 169-171.
- Van Dyk, J. S., Pletschke, B. I. (2012) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1458–1480.

Vidović, P. (2017) Proizvodnja mliječne kiseline na hidrolizatu pšenične slame dobivenom alkalnom predobradom u visokotlačnom reaktoru. Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

7. PRILOZI

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

Tablica: Retencijska vremena i jednadžbe baždarnih pravaca

spoj	jednadžba pravca	RT (min)
glukoza	$y = 377242,1858x - 4487,06$	13,012
ksiloza	$y = 362057,08x + 5598,61$	13,813
arabinoza	$y = 366483,61x + 9888,80$	14,952
mravlja kiselina	$y = 112024,49x + 4968,11$	18,465
octena kiselina	$y = 164952,58x + 2260,95$	19,936
levulinska kiselina	$y = 331566,10x - 865,38$	21,508

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.

A handwritten signature in black ink, reading "Jovana Vrdoljak", is written over a horizontal line.