

Predobrada jelovine

Pavić, Klara

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:819766>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Klara Pavić

7584/BT

PREDOBRADA JELOVINE
ZAVRŠNI RAD

Znanstveno-istraživački projekt: "Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina" (OPB-SLS; HRZZ-9717)

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu u sklopu projekta "Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina" (OPB-SLS; HRZZ-9717) (voditelj projekta red. prof. dr. sc. Božidar Šantek).

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Vlatki Petravić Tominac na predloženoj temi, stručnoj pomoći i savjetima pri izradi ovog rada.

Također zahvaljujem svojoj obitelji, dečku i prijateljima na velikoj podršci tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

PREDOBRADA JELOVINE

Klara Pavić, 0058212860

Sažetak: Lignocelulozne sirovine obuhvaćaju poljoprivredne ostatke, šumski otpad i trave, a sastoje se od celuloze, hemiceluloze i lignina. Koriste se za biotehnološku proizvodnju bioetanol, enzima, organskih kiselina, mikrobne biomase i mnogih drugih proizvoda. Kako bi se mogle koristiti u biotehnološkim procesima, neophodna je predobrada kojom se razgrađuje čvrsta struktura sirovine. Metode predobrade dijele se na fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke. Odabir metode predobrade treba prilagoditi sastavu pojedine sirovine. Meko drvo u prosjeku sadrži veći udio lignina nego druge lignocelulozne sirovine. Ovaj rad daje pregled postupaka predobrade mekog drveta opisanih u literaturi, s posebnim naglaskom na predobradu jelovine. Ovi postupci predobrade provode se kao jednostupanjski ili višestupanjski postupci uz mogućnost kombinacije različitih metoda obrade.

Ključne riječi: jelovina, lignoceluloza, meko drvo, predobrada

Rad sadrži: 41 stranice, 14 slika, 6 tablica, 48 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Rad predan: 1. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Beer
and malt technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology**

PRETREATMENT OF FIR WOOD

Klara Pavić, 0058212860

Abstract: Lignocellulosic raw materials include agricultural residues, forest waste and grasses, and consist of cellulose, hemicellulose and lignin. They are used for biotechnological production of bioethanol, enzymes, organic acids, microbial biomass and many other products. In order to be used in biotechnological processes, a pretreatment is necessary to decompose the solid structure of raw material. The pretreatment methods are divided into physical, chemical, physicochemical and biological methods. The choice of pretreatment method should be made according to the composition of each raw material. Softwood on average contains a higher amount of lignin than the other lignocellulosic raw materials. This paper provides an overview of softwood pretreatment procedures described in the literature, with a special emphasis on fir pretreatment. These pretreatment processes are carried out as single-stage or multi-stage processes with the possibility of combining different processing methods.

Keywords: fir wood, lignocellulose, pretreatment, softwood

Thesis contains: 41 pages, 14 figures, 6 tables, 48 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in: Library of
the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

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

Thesis delivered: September 1st 2020.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Lignocelulozne sirovine	2
2.1.1. Celuloza	3
2.1.2. Hemiceluloza	3
2.1.3. Lignin	4
2.1.4. Ekstraktivne tvari i pepeo	6
2.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina	7
2.2.1. Fizikalna predobrada	9
2.2.2. Kemijska predobrada	10
2.2.3. Fizikalno-kemijska predobrada	13
2.2.4. Biološka predobrada	15
2.2.5. Inhibitori koji nastaju tijekom predobrade	18
2.3. Drvo kao biotehnološka sirovina	19
2.3.1. Jela kao predstavnik mekog drveta	20
2.3.2. Predobrada mekog drveta	23
3. ZAKLJUČAK	37
4. LITERATURA	38

1. UVOD

Lignocelulozne sirovine imaju široku primjenu koja seže daleko u povijest. Nekoć su ljudi koristili lignocelulozne sirovine kao izvor energije (vatra) ili za izradu oruđa. Njihova je primjena proširena na građevinu, izradu materijala, proizvodnju papira, tekstila itd. Lignocelulozne sirovine koriste se i za biotehnološke procese proizvodnje organskih kiselina, enzima, mikrobnog biomase te u bioremedijaciji i mnogim drugim. Sve je više istraživanja provedeno na obnovljivim izvorima energije s ciljem zamjene fosilnih goriva. I na tome području lignocelulozne sirovine nalaze svoju primjenu kao obnovljivi, ekološki prihvatljiv izvor energije (Chen, 2015).

Lignocelulozne sirovine su poljoprivredni ostaci (npr. sijeno, kukuruzni ostaci...), drveni otpad (npr. piljevina) i trave (Kumar i sur., 2009). Za razliku od biomase bogate šećerom i škrobom, lignoceluloza ne konkurira proizvodnji hrane te je jeftinija sirovina. S druge strane tehnološki je zahtjevnija, a troškovi cijele proizvodnje su puno veći. Troškovima najviše pridonose cijene transporta sirovine i proizvodnja enzima za hidrolizu lignoceluloznih sirovina (Brodeur i sur., 2011). Zbog toga se istražuju čimbenici koji će omogućiti veliko iskorištenje procesa (Brodeur i sur., 2011), efikasnu predobradu, uštedu energije itd. (Karimi i sur., 2013)

Lignoceluloza se sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina. Hidrolizom celuloze oslobađa se glukoza, a hidrolizom hemiceluloze oslobađaju se pentoze i heksoze. Najveći izazov predstavlja razgradnja lignina koji povezuje celuloza vlakna u vrlo čvrstu strukturu (Kumar i sur., 2009).

Predobrada sirovine smatra se ključnim procesom za proizvodnju biogoriva (da Costa Sousa i sur., 2009). Cilj je ukloniti lignin i smanjiti kristaliničnost celuloze te tako povećati izloženost ugljikohidrata hidrolitičkim enzimima (Alriksson, 2006). Metode predobrade dijele se na fizikalne, fizikalno-kemijske, kemijske i biološke (Brodeur i sur., 2011).

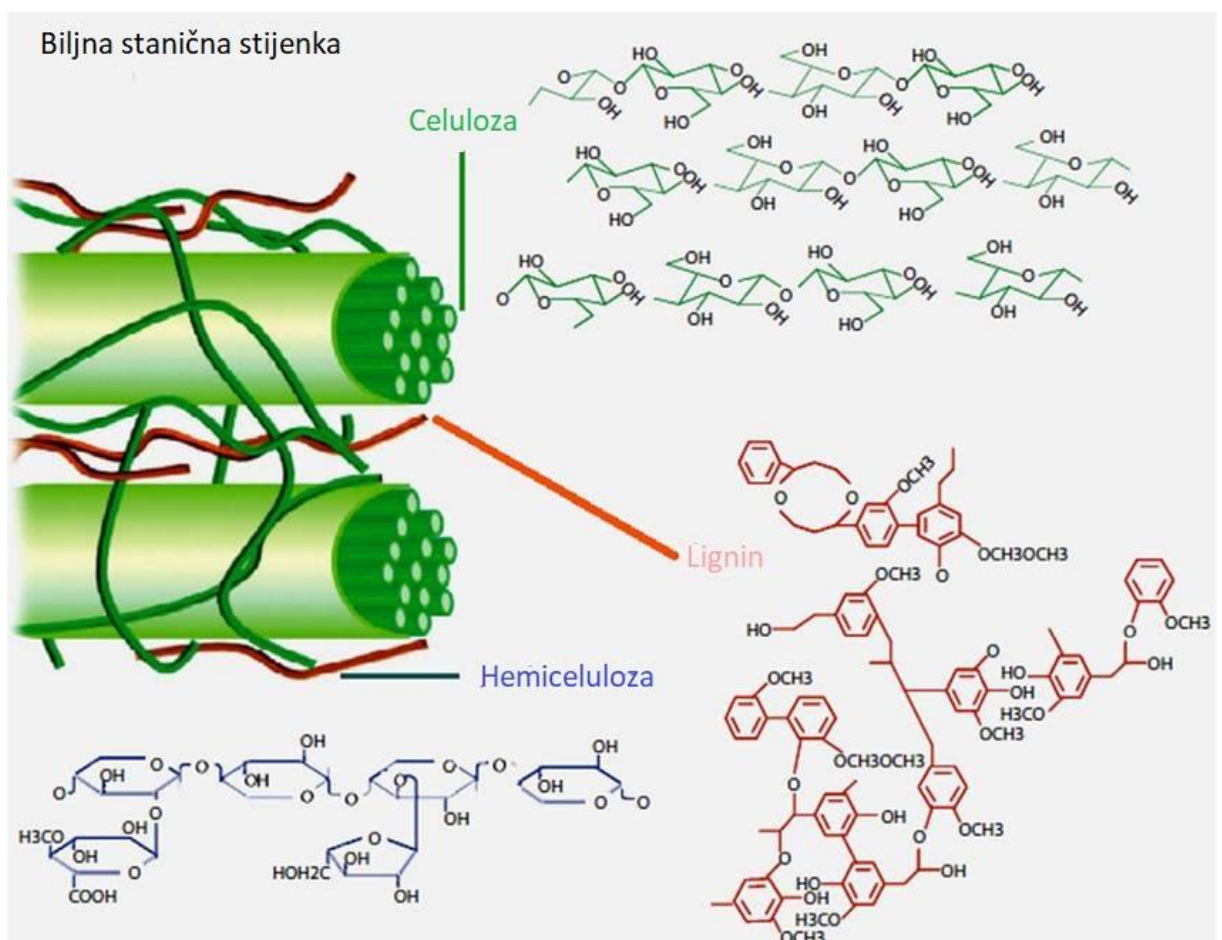
Svrha ovog završnog rada je prvenstveno prikazati pregled metoda predobrade jele, a također su prikazani i primjeri predobrade nekih drugih vrsta mekog drveta.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Lignocelulozne sirovine

Lignocelulozne sirovine građene su od celuloze (36-61 %), hemiceluloze (13-39 %) i lignina (6-29 %) (Rezić i sur., 2016). Udio pojedine komponente ovisi o vrsti biljke (trava, meko ili tvrdo drvo), o dijelu biljke (korijen, list, grane) te o dobi i fazi rasta biljke (Bajpai, 2016). Osim ovih glavnih komponenata, biljke sadrže i određeni postotak ekstraktivnih tvari, a anorganske tvari čine pepeo.

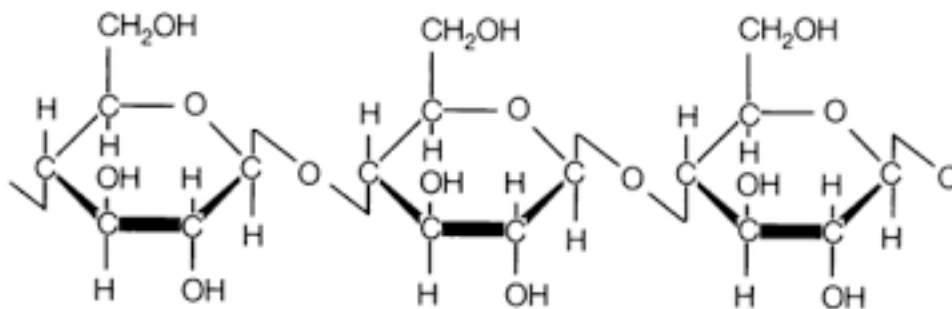
Lignocelulozne sirovine obuhvaćaju poljoprivredne ostatke i industrijski otpad biljnog podrijetla te biljni materijal dobiven nakon prerade drva. Lignoceluloza je sastavni dio stanične stijenke biljnih stanica. Cilj obrade sirovine je ukloniti lignin te hidrolizirati celulozu i hemicelulozu do fermentabilnih šećera koje mikroorganizmi koriste kao supstrat (Kumar i sur., 2009).



Slika 1. Sastav lignoceluloznih sirovina (Bamdad i sur., 2018).

2.1.1. Celuloza

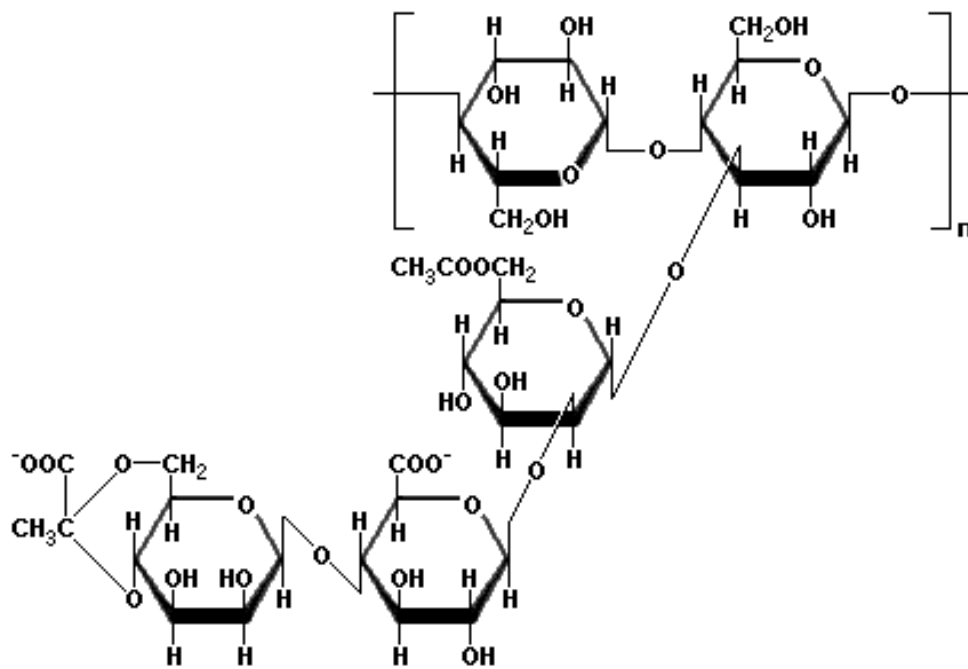
Celuloza je linearni homopolimer D-glukoze. Glukozne jedinice povezane su β -1,4-glikozidnom vezom. Svaka glukoza jedinica je rotirana za 180° u odnosu na susjednu jedinicu. Jedan lanac može činiti 2000-18000 glukoza jedinica (Ross i sur., 1991). Glavnina strukture organizirana je u mikrovlakna. Dugi lanci glukoze se zbog prisutnih hidroksilnih skupina međusobno povezuju vodikovim mostovima. Prisutne su i van der Waalsove veze. Struktura je čvrsta i tvrda. Celuloza je prisutna u dva različita oblika, tj. može imati kristaliničnu i amorfnu strukturu. Amorfna struktura pogodnija je za predobradu jer je pristup enzimima i kemikalijama puno lakši nego kod kristalinične strukture (Kumar i sur., 2009). Zbog svoje čvrstoće, ali i fleksibilnosti, celuloza se često koristi za izradu pomoćnih filtracijskih sredstava, proizvodnju papira, tekstila itd.



Slika 2. Kemijski sastav celuloze (Kumar i sur., 2009).

2.1.2. Hemiceluloza

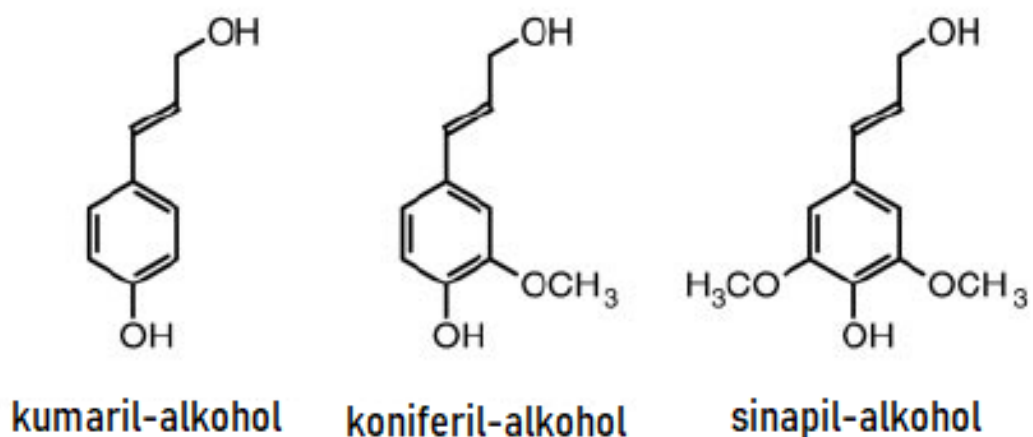
Za razliku od celuloze, hemiceluloza je heteropolimer. Građena je od različitih monosaharida, kao što su pentoze (ramnoza, ksiloza, arabinoza) i heksoze (glukoza, manoza, galaktoza). Hemicelulozu čine kratki lanci, od 500 do 3000 jedinica šećera, koji se međusobno povezuju u razgranatu strukturu (Kumar i sur., 2009). Najzastupljeniji polisaharid u hemicelulozi je ksilan (Andlar, 2018). Zbog svoje razgranate strukture hemiceluloza se lako hidrolizira, a polimeri ne agregiraju čak ni kada kokristaliziraju s celuloznim lancima. Osim šećera, hemiceluloza sadrži i šećerne kiseline: 4-O-metilglukuronska, D-glukuronska i D-galakturonska kiselina (Kumar i sur., 2009).



Slika 3. Struktura hemiceluloze (Kulkarni Vishakha i sur., 2012).

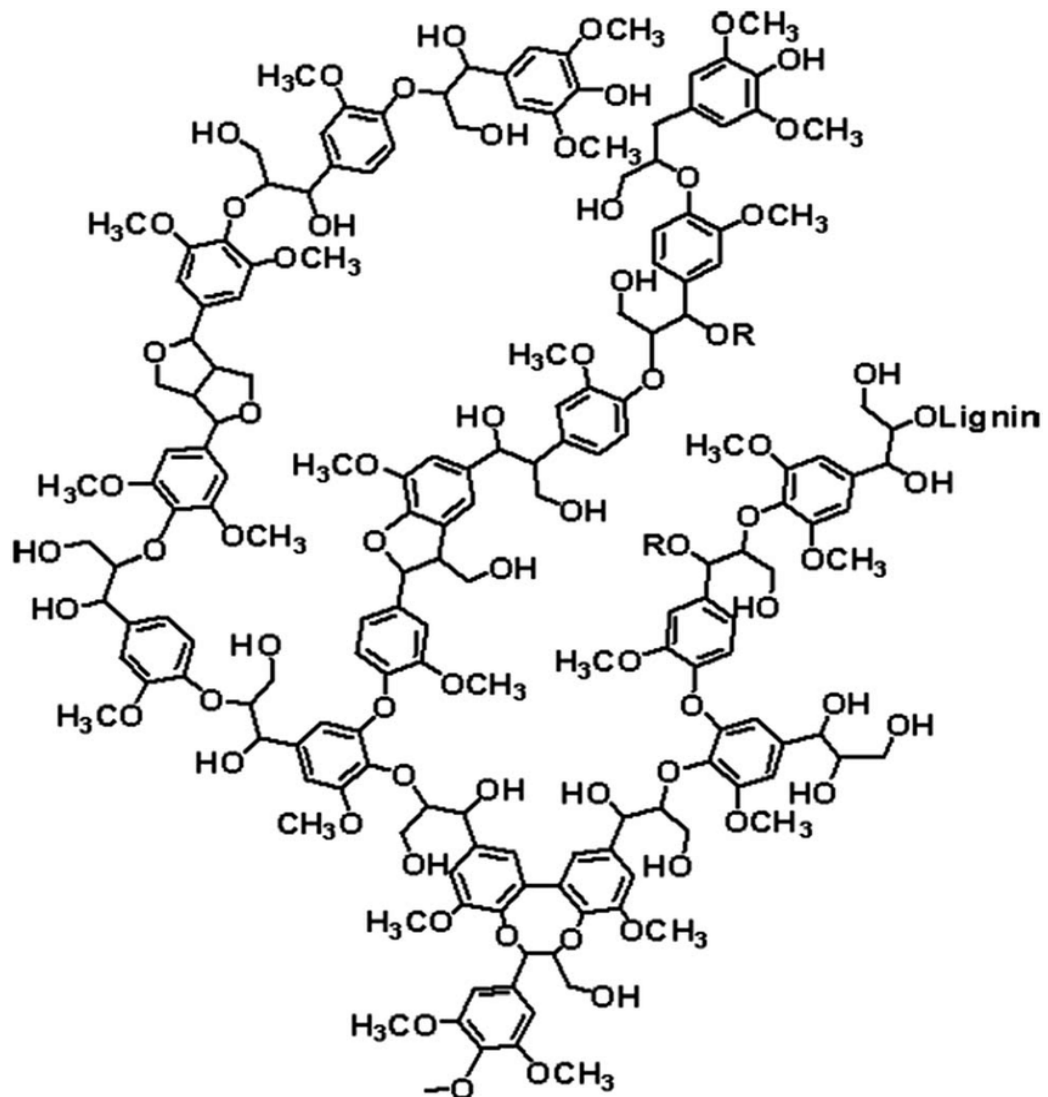
2.1.3. Lignin

Lignin je neugljikohidratni polimer, glavni sastojak drva, koji povezuje celulozna vlakna u staničnoj stijenci biljne stanice. Izgrađuju ga fenolni monomeri: kumaril-alkohol, koniferil-alkohol i sinapil-alkohol. Fenilpropanski derivati povezani su u 3D-strukturu C-C i C-O vezama. Lignin se unakrsno povezuje sa celulozom i hemicelulozom. Između lignina i hemiceluloze kemijskim se vezama povezuju galaktoza i arabinoza (Andlar i sur., 2018).



Slika 4. Monomeri koji izgrađuju lignin (Hatfield i Vermerris, 2001).

Glavna uloga lignina je da biljci daje strukturnu potporu, nepropusnost te zaštitu od mikroorganizama (Kumar i sur., 2009). Udio lignina varira ovisno o vrsti biljke. Općenito, zeljaste biljke poput trava imaju najmanji, dok meko drvo ima najveći udio lignina. Zbog kompleksne, teško razgradive strukture, lignin je potrebno ukloniti kako bi se lignoceleulозна sirovina mogla što bolje enzimski i mehanički obraditi.



Slika 5. Primjer kemijske strukture lignina (Prieur i sur., 2017).

2.1.4. Ekstraktivne tvari i pepeo

Osim osnovnih sastavnih dijelova biljne stanične stijenke (celuloze, hemiceluloze i lignina) postoje i brojne komponente koje ne pripadaju lignocelulozi. Dijelimo ih na organske tvari (ekstraktivne tvari) i anorganske (mineralne tvari, pepeo) (Žeger, 2012). Ekstraktivne tvari su akumulirane u određenim tkivima kao što je srž ili unutarstanične šupljine. Ovoj skupini spojeva pripadaju smole, voskovi, alkaloidi, pektini, terpeni, škrob, jednostavni fenoli, tanini itd. Iako su ekstraktivne tvari zastupljene u malom postotku, imaju veliki utjecaj na svojstva i kvalitetu drveta. Mineralne tvari dobijemo kao pepeo nakon spaljivanja uzorka. Pepeo uglavnom sadrži metalne okside. Mineralne tvari nalazimo u granicama od 0,3 do 1,5 % suhe tvari. Pepeo je bogat kalcijem, magnezijem i kalijem. Tablica 1. pokazuje prosječan udio mineralnih elemenata suhe tvari četinjača, kojima pripada drvo jele. Sastav mineralnih tvari najviše ovisi o vrsti tla na kojemu biljka raste (Žeger, 2012).

Tablica 1. Prosječan udio mineralnih elemenata u suhoj tvari četinjača i listača (Žeger, 2012).

Granica [ppm]	Elementi															
400-1000	K	Ca														
100-400	Mg	P														
10-100	F	Na	Si	S	Mn	Fe	Zn	Ba								
1-10	B	Al	Ti	Cu	Ge	Se	Rb	Sr	Y	Nb	Ru	Pd	Cd	Te	Pt	
0,1-1	Li	Sc	V	Co	Ga	As	Zr	Mo	In	Sb	I	Hf	W	Re	Ir	
<0,1	Au	Hg	Pb	Bi												

2.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina

Prilikom predobrade lignoceluloznih materijala razbija se struktura lignina, smanjuje se kristaliničnost celuloze, a hemiceluloza se djelomično ili potpuno hidrolizira. Predobrada je najskuplji dio proizvodnje i o uspješnosti njene provedbe ovise svi daljnji koraci proizvodnje, kao što su enzimska hidroliza, fermentacija, izdvajanje i pročišćavanje proizvoda, utrošak energije i mnogi drugi.

Osnovni uvjeti za efikasnu predobradu su (Brodeur i sur., 2011):

- Dobiti visokorazgradivu čvrstu fazu što povećava prinos šećera prilikom enzimske hidrolize;
- Izbjeći razgradnju šećera (uglavnom pentozu) iz hemiceluloze;
- Svesti na minimum nastajanje inhibitora fermentacije;
- Iskoristiti lignin za konverziju u vrijedne nusprodukte;
- Smanjiti troškove korištenjem reaktora umjerene veličine te svesti na minimum utrošak topline i energije.

Metode predobrade dijele se na (Kumar i sur., 2009):

- Fizikalne: mljevenje, piroliza, ultrazvuk, mikrovalovi;
- Fizikalno-kemijske: eksplozija parom, mokra oksidacija, eksplozija tekućim amonijakom;
- Kemijske: tretman kiselinom, lužinom, oksidacijskim sredstvima, organskim otapalima;
- Biološke: razgradnja mikroorganizmima i enzimima.

Karakteristike različitih metoda predobrade prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Prednosti i nedostaci metoda predobrade (Maurya i sur., 2015).

Predobrada	Prednosti	Nedostaci
Mljevenje	-Smanjenje kristaliničnosti i stupnja polimerizacije celuloze -Smanjenje dimenzija čestica čime se povećava specifična površina	-Velik utrošak energije
Koncentrirane kiseline	-Veliki prinos glukoze -Temperatura okoline	-Velika cijena kiselina koje se moraju reciklirati -Potrebna oprema otporna na koroziju -Koncentrirane kiseline su toksične i opasne
Razrijeđene kiseline	-Veliko iskorištenje šećera na kraju procesa -Manja tvorba toksičnih produkata	-Relativno mala koncentracija reducirajućih šećera -Nastajanje razgradnih produkata
Lužine	-Smanjenje stupnja polimerizacije i kristaliničnosti celuloze -Remećenje strukture lignina	-Velika cijena -Ne koristi se u realnom mjerilu
Ozonoliza	-Učinkovito uklanjanje lignina -Ne nastaju toksični produkti -Reakcija se provodi pri sobnoj temperaturi i tlaku	-Veliki troškovi zbog velike količine ozona
Organosolv (organska otapala)	-Uzrokuje hidrolizu lignina i hemiceluloze	-Otapala se moraju izdvojiti i reciklirati -Veliki troškovi
Eksplozija parom	-Uzrokuje transformaciju lignina i otapanje hemiceluloze -Manji troškovi -Veći prinosi glukoze i hemiceluloze u dvostupanjskom procesu	-Nastajanje toksičnih produkata -Djelomična razgradnja hemiceluloze
Vruća tekuća voda	-Nije potrebno smanjenje čestica biomase -Nije potrebno korištenje kemikalija -Nije potrebna oprema otporna na koroziju	-Potrebno puno energije i velike količine vode -Nastajanje toksičnih produkata
Eksplozija amonijakom (AFEX)	-Povećava dostupnu površinu za hidrolizu -Manje nastajanje inhibitora -Ne zahtijeva male čestice sirovine	-Nije efikasna za sirovine s velikim udjelom lignina -Veliki troškovi zbog upotrebe velike količine amonijaka

Tablica 2. (nastavak)

Eksplוזija s CO ₂	-Povećava dostupnu površinu za hidrolizu -Relativno jeftina -Nema tvorbe inhibitora -Nezapaljivo -Ekološki prihvatljiva metoda	-Potrebni vrlo visoki tlakovi
Mokra oksidacija	-Veliki stupanj otapanja hemiceluloze i lignina -Izbjegava se nastajanje razgradnih spojeva	-Velika cijena kisika i alkalnih katalizatora
Biološke metode	-Mala potreba za energijom -Delignifikacija -Smanjenje stupnja polimerizacije celuloze -Djelomična hidroliza hemiceluloze -Ne koriste se kemikalije -Blagi uvjeti obrade	-Spor proces -Vrlo niski prinosi -Nije djelotvorno za komercijalnu primjenu

2.2.1. Fizikalna predobrada

Fizikalnim metodama predobrade biomasa se usitnjava, smanjuje se stupanj polimerizacije te se povećava kontaktna površina za djelovanje enzima ili kemikalija.

Za mehaničko usitnjavanje mogu se koristiti mlinovi čekićari, kuglični mlinovi, valjci itd. Veličina čestica nakon sjeckanja je 10-30 mm, a nakon mljevenja 0,2-2 mm (Kumar i sur., 2009). Usitnjavanje može biti suho ili mokro. Energija koja se pritom utroši ovisi o vrsti sirovine i konačnoj veličini čestica. U većini slučajeva, kada se za predobradu koristi samo fizikalna metoda, stvarni utrošak energije je puno veći nego teorijski (Brodeur i sur., 2011). Provedba jedne fizikalne metode nije efikasna pa se one najčešće provode prije ili zajedno s kemijskom ili biološkom predobradom (Taherzadeh i Karimi, 2008). Smanjenje veličine čestica može se provesti i nakon kemijske obrade. Najveća prednost naknadnog usitnjavanja je manji utrošak energije, ali se usitnjavanje ne može provesti nakon svih metoda (Karimi i sur., 2013).

Piroliza je fizikalna metoda koja razgrađuje organski materijal primjenom topline. Za razliku od procesa spaljivanja, piroliza se odvija bez prisutnosti kisika. Celuloza, hemiceluloza i lignin se raspadaju u plinovite molekule, koje se potom kondenziraju u tekuće stanje i postaju

bio-ulje (Chen i sur., 2007). Temperature obrade su veće od 300 °C. Pri manjim temperaturama razgradnja je puno sporija, a nastali spojevi su manje hlapivi (Kumar i sur., 2009).

Još jedna od metoda fizikalne predobrade je ultrazvuk. Ultrazvuk je najčešće testiran u laboratorijskim uvjetima. Njegova efikasnost poznata je u tretiranju mulja nakon obrade otpadnih voda. Za lignocelulozne sirovine mehanizam usitnjavanja je nepoznat. Pretpostavlja se da pucaju vodikove veze kada je primijenjena energija veća od energije veze (Boчек, 2003).

Djelovanjem γ -zraka se razaraju β -1,4-glikozidne veze te se povećava površina i smanjuje kristaliničnost celuloze. Ova metoda je zasad pokazala dobre rezultate u laboratoriju, ali je preskupa da bi se koristila u realnom većem mjerilu (Kumar i sur., 2009).

Fizikalna predobrada nije dovoljna za veliko povećanje konverzije šećera, međutim većina drugih vrsta obrade nije učinkovita bez minimalnog smanjenja veličine čestica, osobito da bi se prevladali problemi prilikom transporta mase i topline. Zbog toga se fizikalne metode kombiniraju s ostalim metodama. Također je važno uočiti da fizikalna predobrada, nakon određene veličine čestica, postaje ekonomski neisplativa (da Costa Sousa i sur., 2009).

2.2.2. Kemijska predobrada

Kemijske metode predobrade obuhvaćaju obrade kiselinama, lužinama, oksidacijskim sredstvima, organskim otapalima, ozonolizu itd. Ova skupina metoda smatra se najperspektivnijom za buduće biorafinerije, ali se u obzir moraju uzeti još i tehnički, ekološki i ekonomski čimbenici (da Costa Sousa i sur., 2009).

Kiselinska predobrada uključuje korištenje koncentriranih i razrijeđenih kiselina za razbijanje strukture sirovine, a proces se provodi tako da se biomasi doda koncentrirana ili razrijeđena kiselina (obično masenog udjela 0,2–2,5 % w/w) te se konstantno miješa pri temperaturama 130-210 °C. Ovisno o uvjetima predobrade, hidroliza može trajati od nekoliko minuta do nekoliko sati (Brodeur i sur., 2011).

Kiselinska predobrada je najkorištenija metoda cijepanja glikozidnih veza u hemicelulozi. Cijepanje glikozidnih i glukuronozilnih veza može se dogoditi u relativno blagim uvjetima, dok se razgradnja oslobođenih monosaharida može odvijati samo u žestokim uvjetima (Karimi i sur., 2013). Struktura celuloze pri povišenim temperaturama u kiselom mediju postaje nestabilna zbog cijepanja vodikove veze, koja je glavna sila koja povezuje celulozne lance. Nakon remećenja kristalne strukture celuloze, molekule kiseline mogu prodrijeti u celulozu. U tekućoj fazi se može pojaviti lignin topiv u kiselini, koji inače formira kompleks s ugljikohidratima. Hidroliza razrijeđenom kiselinom može učinkovito cijepati veze između hemiceluloze i lignina te hidrolizirati glikozidne veze u hemicelulozi. Nakon obrade, tekuća faza sadrži uglavnom

razgradne produkte hemiceluloze, a čvrsta faza se sastoji uglavnom od razgradnih produkata celuloze i lignina. Jedan od problema koji se javljaju pri kiselinskoj hidrolizi je djelomična razgradnja šećera, uglavnom ksiloze do furfurala. Dio ksiloze ostaje u čvrstom ostatku. Od komercijalno dostupnih kiselina najviše se koristi sumporna kiselina. Ona se tradicionalno koristila za proizvodnju furfurala, budući da se hidrolizom hemiceluloze dobiju monosaharidi, poput ksiloze, koji se dalje prevode u furfural. Danas se koristi za obradu nekih vrsta trave poput unakrsnog prosa (lat. *Panicum virgatum*, engl. switchgrass), kukuruzovine te mekog drva poput smreke (engl. poplar) i mekog drva poput topole. Osim sumporne kiseline još su istraživane klorovodična kiselina, fosforna kiselina i dušična kiselina. Prednost korištenja koncentriranih kiselina je kratko vrijeme obrade i male temperature. Ponekad nakon kiselinske predobrade uopće nije potrebna naknadna enzimaska hidroliza jer sama kiselina hidrolizira biomasu do fermentabilnih šećera (Brodeur i sur., 2011) no potrebno je temeljito ispiranje i/ili detoksikacija kako bi se prije hidrolize odnosno fermentacije uklonila kiselina i nastali inhibitori. Također, same kiseline su toksične, korozivne i opasne zbog čega je potrebno koristiti puno skuplju opremu (Kumar i sur., 2009; Brodeur i sur., 2011).

Zbog tih nedostataka najčešće se koriste razrijeđene kiseline i to 4 %-tna (w/v) sumporna kiselina. Razrijeđene kiseline su jeftine i efikasne, a s povećanjem temperature i vremena zadržavanja, nakuplja se više nusproizvoda (Hu i sur., 2010). Nakon obrade, potrebna je neutralizacija (Kumar i sur., 2009). Za dobru obradu lignoceluloznih sirovina, efikasnim su se pokazala dva tipa procesa. Prvi tip je dvostupanjski proces, koji u prvom koraku koristi razrijeđenu kiselinu pri manjim temperaturama, a u drugom koraku provodi se hidroliza čvrstog ostatka koncentriranom kiselinom pri većoj temperaturi. Pritom se hidrolizira 90% hemiceluloze i 40-60 % celuloze (Rezić i sur., 2016). Drugi tip je kombinacija kiselinske obrade (hidroliza hemiceluloze) s alkalnom obradom (koja djeluje na lignin) pri čemu se dobije čista celuloza (Brodeur i sur., 2011).

Alkalna predobrada se provodi primjenom lužina. One razgrađuju esterske i glikozidne veze pri čemu se razdvajaju lignin i ugljikohidrati, djelomično se dekrizalizira celuloza i djelomično hidrolizira hemiceluloza (Brodeur i sur., 2011). Lužine djeluju na acetilne skupine (da Costa Sousa i sur., 2009). Chang i Holtzaple (2000) su pokazali da je za efikasnu predobradu lignoceluloznih sirovina potrebno ukloniti sve acetilne grupe i oko 10 % lignina zbog čega alkalna predobrada ima veliku prednost pred ostalim metodama. Također, obrada lužinama provodi se pri puno manjim temperaturama i manjim tlakovima nego druge metode. U usporedbi s kiselinskom predobradom, lužine uzrokuju manju razgradnju šećera (Kumar i sur., 2009). Veliki nedostatak alkalne predobrade je dugo trajanje procesa koje se mjeri u satima i danima. Lužine koje se koriste su natrijev, kalijev, amonijev i kalcijev hidroksid, a najviše je istraživana obrada

natrijevim hidroksidom. Razrijeđeni natrijev hidroksid uzrokuje bubrenje, a time i povećanje površine biomase, smanjenje stupnja polimerizacije, smanjenje kristaliničnosti, odvajanje lignina od ugljikohidrata i remeti strukturu lignina. Problem kod korištenja natrijeve lužine je nastajanje soli koje se mogu inkorporirati u biomasu (Kumar i sur., 2009). Za obradu se može koristiti i vapno koje je jeftinije, a dio se nakon odvajanja od biomase može reciklirati obradom s CO₂ (Brodeur i sur., 2011). Proces obrade vapnom započinje miješanjem vapna s vodom, prelijevanjem preko biomase i zadržavanjem u optimalnim uvjetima do nekoliko tjedana. Povećanjem temperature moguće je skratiti vrijeme zadržavanja (Kumar i sur., 2009). Osim dugog trajanja obrade, nedostatak alkalne predobrade je teško, gotovo nemoguće recikliranje kemikalija i veliki utrošak vode za ispiranje. Predobrada lužinama pokazala je veću efikasnost u kombinaciji s drugim metodama kao što su eksplozija parom, oksidacijski tretman, mikrovalovi i ultrazvuk (Karimi i sur., 2013).

Još jedan proces kemijske predobrade je ozonoliza. Njome se smanjuje udio lignina, hemiceluloza se djelomično razgrađuje, a celuloza ostaje netaknuta. Ozonoliza se provodi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku. Tijekom predobrade ne nastaju inhibitori pa nije potrebna detoksikacija. Proces ozonolize je skup jer je potrebna velika količina ozona pa se zbog toga ne primjenjuje u industriji (Kumar i sur., 2009).

Organosolv je metoda koja koristi organska otapala za hidrolizu veza između lignina i hemiceluloze. Time se povećava porozna struktura celuloze što omogućuje bolju enzimsku hidrolizu u sljedećem koraku. Koriste se metanol, etanol, glicerol, organske kiseline i esteri. Reakcija se može odvijati i uz pomoć katalizatora (salicilna ili sumporna kiselina). Proces se provodi pri 90-120 °C za trave te 155-220 °C za drvo uz vrijeme zadržavanja 25-100 minuta (da Costa Sousa i sur., 2009). Otapala koja se obično koriste u organosolv postupku nakon ispuštanja iz reaktora se uparuju, kondenziraju i recikliraju kako bi se smanjili troškovi. Uklanjanje otapala je neophodno jer ona mogu inhibirati rast mikroorganizama, enzimsku hidrolizu i fermentaciju (Kumar i sur., 2009), međutim pročišćavanje je skupo pa organosolv ima ograničenu primjenu.

Za obradu lignoceluloznih sirovina mogu se koristiti i ionske tekućine. To su otopine soli, obično sastavljene od malih anorganskih aniona i velikih organskih kationa (Brodeur i sur., 2011), koje pri velikoj temperaturi tvore vodikove veze s celulozom zbog čega se poremeti struktura sirovine (da Costa Sousa i sur., 2009). Odabir otapala jako je bitan i ovisi o vrsti sirovine koja se obrađuje. Zbog skupoće otapala, troškovi su puno veći ako se ona ne recikliraju. Nakon obrade potrebno je ukloniti otapala jer ona mogu inhibirati enzime (Brodeur i sur., 2011). Ako se otapalo inkorporira u strukturu sirovine, potrebne su velike količine vode za ispiranje zbog čega proces postaje još skuplji (Karimi i sur., 2013). *N*-metilmorofolin-*N*-oksid (NMMO) je

otapalo koje smanjuje kristaliničnost celuloze. Koristi se NMMO čistoće 83-87 %. Ovo otapalo je biorazgradivo i nije toksično. Proces se odvija pri atmosferskom tlaku i 120-130 °C, a ovisno o sirovini traje od 20 minuta do 5 sati (Karimi i sur., 2013).

2.2.3. Fizikalno-kemijska predobrada

Fizikalno-kemijske metode ujedinjuju fizikalne i kemijske metode predobrade. Ovoj skupini metoda pripadaju eksplozija parom, eksplozija amonijakom, eksplozija s ugljikovim dioksidom i mokra oksidacija (Brodeur i sur., 2011).

Eksplozija parom jedna je od najčešće korištenih metoda predobrade lignoceluloznih sirovina. Sirovina se izlaže utjecaju zasićene vodene pare pri velikom tlaku i temperaturi kroz kraći vremenski period. Zatim slijedi nagla dekompresija zbog čega se remeti struktura vlakana te se povećava mogućnost pristupa enzima celulozi. Veličina čestica je jako bitna za ovu metodu te relativno velike čestice daju veći prinos šećera. To je velika prednost jer nije potrebno dodatno mehaničko usitnjavanje koje povećava troškove. O veličini čestica ovisi i koja će se temperatura i vrijeme zadržavanja koristiti. Temperatura je u rasponu 190-270 °C, a vrijeme zadržavanja 1-10 minuta (Brodeur i sur., 2011). Tlakovi koji se koriste iznose 0,69-4,83 MPa (Kumar i sur., 2009). Kemijski dio ove metode je hidroliza glikozidnih veza između hemiceluloze i celuloze i remećenje strukture lignina, a fizikalni dio obuhvaća naglu dekompresiju. Ballesteros i sur. (2006) su istraživali eksploziju vodenom parom uz korištenje razrijeđene kiseline. Pokazali su da je korištenjem kiseline hidroliza hemiceluloze bolja, a vrijeme zadržavanja se smanjuje. Također, ako se koriste kiseline, hidroliza mekog drva je puno učinkovitija (Vignon i sur., 1995). Eksplozija vodenom parom nije štetna za okoliš, učinkovita je i kapitalni troškovi nisu veliki. Troškovi su veći ako se koristi kiselina jer je potrebna neutralizacija i odgovarajuća oprema otporna na kiselinu. No, ovom metodom ne razgrađuju se potpuno kompleksi lignina i ugljikohidrata, hidroliza hemiceluloze nije potpuna te je moguć nastanak inhibitora (Kumar i sur., 2009).

Eksplozija amonijakom ili AFEX (engl. *ammonia fiber explosion*) slična je metodi eksplozije vodenom parom. Sirovini se dodaje tekući amonijak pri umjerenoj temperaturi i velikom tlaku te se nakon kraćeg vremena zadržavanja provodi nagla dekompresija. Temperature su znatno manje (60–140 °C) nego kod eksplozije vodenom parom, pa je utrošak energije manji. Vrijeme zadržavanja je od 5 do 45 minuta, ovisno o vrsti sirovine (da Costa Sousa i sur., 2009; Brodeur i sur., 2011). Za obradu različitih vrsta sirovine koristi se 0,3-2 kg amonijaka po kg suhe tvari biomase (Alizadeh i sur., 2005; da Costa Sousa i sur., 2009; Kumar i sur., 2009; Brodeur i sur., 2011). Recikliranje amonijaka je nužno da bi se smanjili troškovi (Brodeur i sur., 2011). Eksplozija amonijakom koristi se za razne vrste zeljastih biljaka i trava. Ovom metodom otapa

se samo mali dio suhe tvari, tj. uklanja se samo malo lignina i hemiceluloze. Pritom se hemiceluloza razgrađuje u oligomere i deacetilira, ali nije topljiva. Obzirom da drvo sadrži veći udio lignina, ova metoda predobrade za njega nije prikladna (Kumar i sur., 2009).

Da bi se mogle primijeniti manje temperature nego kod eksplozije vodenom parom te smanjiti troškove u odnosu na metodu eksplozije amonijakom, razvijena je metoda eksplozije superkritičnim ugljikovim dioksidom (Kumar i sur., 2009). Superkritični fluid (engl. supercritical Fluid, SCF) je fluid koji se nalazi iznad svoje kritične temperature i kritičnog tlaka pri kojem tekućina i plin koegzistiraju. Jedinstvena svojstva superkritičnih tekućina različita su od svojstava plinova i tekućina pri standardnim uvjetima – imaju gustoću kao tekućina, a viskoznost i difuzivnost poput plina. Stoga, SCF ima mogućnost prodiranja u kristalnu strukturu lignocelulozne biomase, prevladavajući ograničenja prijenosa mase koja postoje pri drugim vrstama obrade (Brodeur i sur., 2011). CO₂ postaje superkritičan pri relativno blagim uvjetima (31 °C i 7,4 MPa) (Harmsen i sur., 2010). Smatra se da CO₂ dobro hidrolizira hemicelulozu kao i celulozu. Prilikom nagle dekompresije celulozna struktura se razara, povećavajući površinu dostupnu za hidrolizu (Kumar i sur., 2009). Pretpostavlja se da se stupanj hidrolize povećava zbog toga što CO₂ otopljen u vodi tvori ugljičnu kiselinu (karbonatna kiselina, H₂CO₃) (Karimi i sur., 2013). Za razliku od eksplozije vodenom parom ne nastaje velika količina inhibitora niti se šećeri degradiraju jer se koriste niže temperature.

Mokra oksidacija je proces koji koristi kisik kao oksidans za spojeve otopljene u vodi, a tijekom tog procesa odvijaju se dvije reakcije. Prva reakcija je hidroliza pri maloj temperaturi, a druga je oksidacija pri velikoj temperaturi. Proces započinje sušenjem i mljevenjem sirovine na veličinu oko 2 mm duljine. Zatim se dodaje voda (oko 1 L na 6 g biomase). Može se dodati natrijev karbonat za smanjenje nastajanja nusprodukata. Zadnji korak je pumpanje zraka u posudu dok se ne dostigne 12 bara. Temperatura iznosi 195 °C, a vrijeme procesa je 10-20 minuta. Tijekom mokre oksidacije lignin se razgrađuje na ugljični dioksid, vodu i karboksilne kiseline. Količina lignina uklonjenog ovom metodom predobrade kreće se od 50 do 70 %, ovisno o vrsti biomase i primijenjenim uvjetima (Brodeur i sur., 2011).

2.2.4. Biološka predobrada

Biološka predobrada uključuje korištenje mikroorganizama (uglavnom funga) i enzima koji degradiraju lignin i hemicelulozu, dok celuloza uglavnom ostaje netaknuta. Razgradnja lignina odvija se djelovanjem odgovarajućih enzima koje izlučuju fungi.

Uvjeti predobrade su blagi, ekološki prihvatljivi te proces nije skup zbog manjeg utroška energije, što su glavne prednosti bioloških metoda. Ipak, biološke metode predobrade nisu u širokoj upotrebi jer su male brzine hidrolize i proces predugo traje za industrijsku primjenu (Brodeur i sur., 2011), a također dolazi do potrošnje jednog dijela polisaharida. Za predobradu se najčešće koriste gljive bijelog truljenja (Slika 8). One proizvode ekstracelularne enzime koji djeluju sinergistički i razgrađuju osnovne komponente lignoceluloznih sirovina (Andlar i sur., 2018). Još jedna velika prednost je dobra razgradnja lignina pomoću peroksidaza i lakaza koje proizvode mikroorganizmi. Osim funga za biološku predobradu mogu se koristiti bakterije i gotovi enzimski pripravci. Tablica 3. prikazuje usporedbu pristupa biološke obrade u kojima se primjenjuju čiste ili mješovite kulture mikroorganizama te različiti enzimski preparati.



Slika 6. Gljiva bijelog truljenja *Stereum hirsutum* (hrv. dlakava pločica) (Anonimus 1, 2020).

Tablica 3. Tehnološki pristupi biološke predobrade (prilagođeno iz Zabel i sur., 2019).

Metode biološke predobrade	Prednosti	Nedostaci	Napomena
<p>Predobrada fungima (čista fungalna kultura uzgaja se submerzno ili na čvrstim supstratima)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mali troškovi predobrade • Minimalno nastajanje otpada • Mali troškovi downstream procesa • Minimalno nastajanje inhibitora ili ih nema • Mali utrošak energije 	<ul style="list-style-type: none"> • Gubitak ugljikohidrata • Dugo vrijeme obrade (tjedni ili mjeseci) 	<p>Učinkovit za uklanjanje lignina iz lignocelulozne biomase, ali usko grlo su dugo trajanje i gubitak holoceluloze</p>
<p>Predobrada bakterijama</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Brže rastu nego fungi (nekoliko dana) • Relativno kratko vrijeme obrade • Lakša genetička manipulacija nego kod funga • Ekonomski isplativije od funga • Bolja adaptacija nego fungi • Minimalno nastajanje inhibitora ili ih nema 	<ul style="list-style-type: none"> • Lošija razgradnja lignina u odnosu na obradu fungima 	<p>Obećavajuće za ekonomski povoljnu prethodnu obradu, posebno za biomasu mikroalgi</p>
<p>Predobrada djelovanjem mikrobnog konzorcija (mješovita kultura, tj. kokultura: gljiva-gljiva, bakterija-bakterija ili bakterija-gljiva)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Relativno kratko vrijeme inkubacije (nekoliko dana) u odnosu na predobradu fungima • Kompleksna mikrobna zajednica ubrzava hidrolizu organskih tvari što omogućava pristup enzimima • Za razaranje lignina potrebno je kontinuirano i stabilni nastajanje metabolita • Veća produktivnost i razgradnja biomase 	<ul style="list-style-type: none"> • Pojedini sojevi mogu se teško adaptirati na fluktuacije uvjeta 	<p>Može biti obećavajuća predobrada biomase mikroalgi, korištenjem mješavine hidrolitičkih bakterijskih sojeva</p>

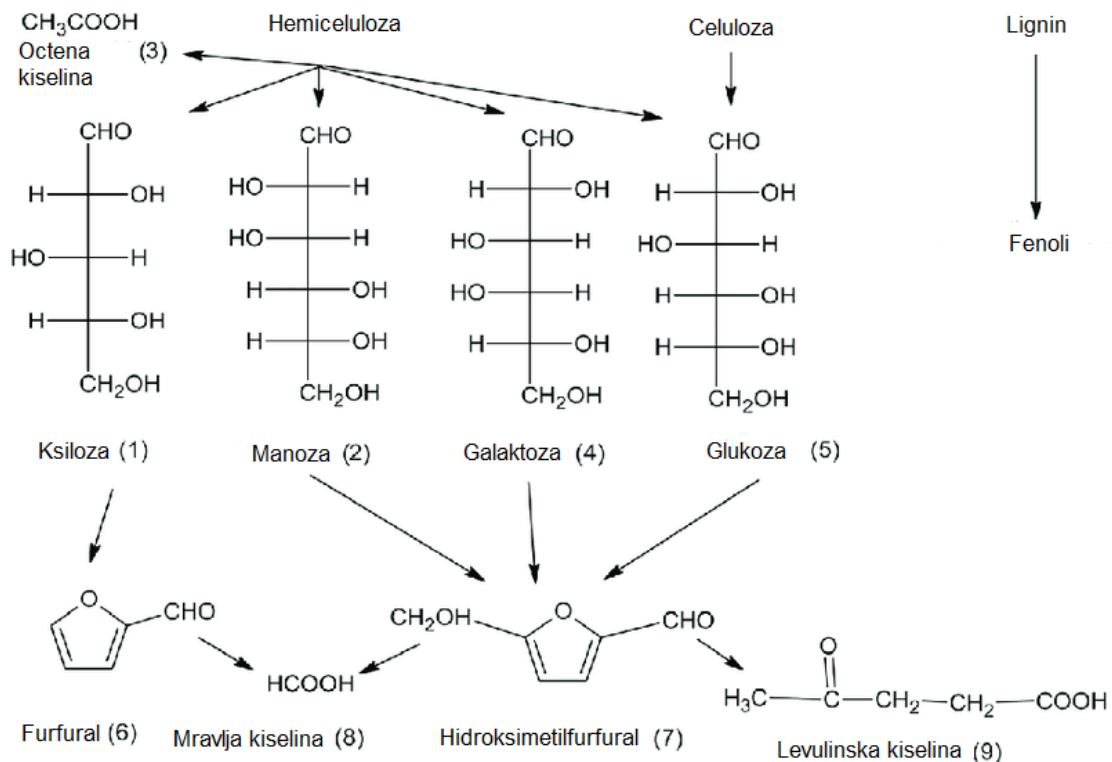
Tablica 3. (nastavak)

Metode biološke predobrade	Prednosti	Nedostaci	Napomena
<p>Predobrada enzimima (čisti ili pročišćeni; enzimski kokteli; ligninolitički ili hidrolitički ili mješavine)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Kratko vrijeme inkubacije (sati do nekoliko dana) u usporedbi s fungima i bakterijama • Hidroliza makromolekula koja omogućava daljnje reakcije konverzije (osobito tijekom proizvodnje bioplina) 	<ul style="list-style-type: none"> • Proizvodnja i pročišćavanje enzima može biti skupo • Loša stabilnost lignolitčkih enzima u industrijskim procesima 	<p>Najefikasnija biološka obrada, posebno za predobradu biomase mikroalgi</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Predobrada siliranjem (istovremeno skladištenje i predobrada biomase pomoću različitih bioloških sustava, npr. mješavine bakterija mliječne kiseline ili mješavine bakterija mliječne kiseline i hidrolitičkih enzima) 	<ul style="list-style-type: none"> • U širokoj primjeni za čuvanje usjeva. • Može se provesti u umjerenim uvjetima. • Minimalno nastajanje otpada ili ga nema • Mali troškovi downstream procesa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Dugo vrijeme inkubacije (tjedni do mjeseci) • gubitak organske tvari (uglavnom celuloze i hemiceluloze) 	<p>Obećavajuće za istovremeno skladištenje i predobradu lignocelulozne biomase i biomase mikroalgi</p>

2.2.5. Inhibitori koji nastaju tijekom predobrade

Tijekom predobrade nastaju nusproizvodi razgradnje hemiceluloze i lignina koji mogu imati inhibirajući učinak na fermentaciju. Inhibitore možemo svrstati u tri skupine: derivati furana, fenoli i organske kiseline. Količina toksičnih spojeva ovisi o vrsti sirovine, uvjetima predobrade i trajanju hidrolize (Bellido i sur., 2011). Stupanj inhibicije ovisi o broju hidroksilnih i metilnih grupa (Qin i sur., 2016).

Nastajanje inhibitora tijekom predobrade prikazano je na Slici 8. Razgradnjom hemiceluloze oslobađaju se ksiloza, manozna, galaktoza, glukoza i octena kiselina, a celuloza se razgrađuje do glukoze. Pri velikim temperaturama i velikom tlaku heksoze se razgrađuju i nastaje 5-hidroksimetil-furfural (HMF), a ksiloza se razgrađuje do furfurala. Od kiselina su najčešće prisutne octena, mravlja i levulinska kiselina. Mravlja kiselina nastaje razgradnjom furfurala i 5-hidroksimetil-furfurala. Levulinska kiselina nastaje također razgradnjom 5-hidroksimetil-furfurala, dok octena kiselina nastaje deacetiliranjem hemiceluloze. Fenolni spojevi nastaju razgradnjom lignina (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000).



Slika 7. Nastajanje inhibitora (Chandel i sur., 2011).

Furfural inaktivira replikaciju stanice, a derivati lignina, kao što su fenoli, narušavaju strukturu membrane i utječu na stanični rast i asimilaciju šećera. Fenoli su toksičniji od furana i organskih kiselina. Pritom su fenoli manje molekulske mase toksičniji od visokomolekulskih fenolnih spojeva (Chandel i sur., 2011). Nedisocirane kiseline mogu pasivno difundirati kroz staničnu membranu čime dolazi do zakiseljavanja citoplazme. Kako bi uspostavila kemijsku ravnotežu, stanica troši veliku količinu energije zbog čega joj ponestaju molekule ATP-a za druge energetske važne procese pa umire (Almeida i sur., 2017).

Inhibitori koji nastaju u najvećoj koncentraciji prilikom obrade mekog drveta su octena kiselina i furfural (Chandel i sur., 2011). Da bi fermentacija bila što uspješnija, provodi se detoksikacija (neutralizacija, membranske tehnike, korištenje enzima...) i pokušava se osigurati optimalne uvjete predobrade kako bi razgradnja šećera do inhibirajućih produkata bila što manja.

2.3. Drvo kao biotehnoška sirovina

Hrvatska ima vrlo dugu tradiciju u obradi drveta. Ova tradicija izrasta na prvim industrijskim kapacitetima koji su pripadali pilanama i proizvodnji piljene građe. Razvoju te gospodarske grane pridonijela je šumovitost zemlje, tradicija u obrtništvu i, naravno, pripadnost europskim gospodarskim tokovima. Šume i šumska zemljišta u Republici Hrvatskoj čine jedinstveno šumskogospodarsko područje na površini od 26 887 km², odnosno na 47 % ukupne kopnene površine države (Ištvančić i sur., 2008).

Nazivi listače i četinjače koriste se pretežito u šumarskoj literaturi. Listače su kritosjemenjače kojima listovi imaju široke ravne površine raznih oblika, isprepletene mrežastom nervaturom (Hrvatska enciklopedija, 2020a), za razliku od golosjemenjača (četinjača), koje imaju drugačije listove. Četinjače (Pinidae; Coniferae) su podrazred golosjemenjača, kojemu pripada crnogorično drveće i grmlje (Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje, 2020b). Stablo im je većinom razgranjeno, a krošnja ima često piramidalan oblik. Listovi su razmjerno mali, igličasti (četine) ili ljuskasti, a poredani su izmjenično, nasuprotno ili pršljenasto. U stablu i listovima česti su kanali sa smolom (smolenice). Četinjače se obično dijele u tri (šire shvaćene) porodice: borove, čemprese i tise. Četinjača ima najviše u sjevernom dijelu euroazijskog i američkog kopna. One ondje tvore goleme šume od kojih su najveće tajga i kanadska sjeverna šuma. Te šume imaju veliku ekonomsku važnost jer se u njima proizvode velike količine drva. Šume četinjača pokrivaju i planine mnogih dijelova svijeta. U njima prevladavaju bor, smreka, jela i ariš. Na istoku u euroazijskim šumama četinjača prevladavaju sibirski bor, sibirski jela, sibirski

ariš i dahurijski ariš. Šumski bor i obična smreka važne su vrste u zapadnoj Europi. U sjevernoameričkim šumama četinjača prevladavaju bijela smreka, crna smreka i balzamska jela. U nas četinjače pokrivaju oko 17 % šumskih površina. U gorama i planinama šume tvore jela i obični bor, a u višim dijelovima smreka. Na gornjoj granici šumske vegetacije raste bor krivulj. Crni bor raširen je na unutarnjim, submediteranskim i hladnijim mediteranskim šumskim terenima. U sredozemnome području tvori autohtone šume. Umjetnim putem znatno je proširen alepski bor. Na Mljetu samoniklo raste pinj (pinija). Od borovica vrlo je raširena obična borovica. U mediteranskim i toplijim submediteranskim predjelima česta je smrika, a u izrazito mediteranskima primorska somina i pukinja. Među udomaćene četinjače ubraja se čempres. U nas se često u šumskim i parkovnim nasadima uzgajaju cedrovi, različiti borovi, jele i smreke, pačempresi, čempresi, tuje, duglazije, čuge, borovice, mamutovci ili sekvoje, taksodiji (Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje, 2020b).

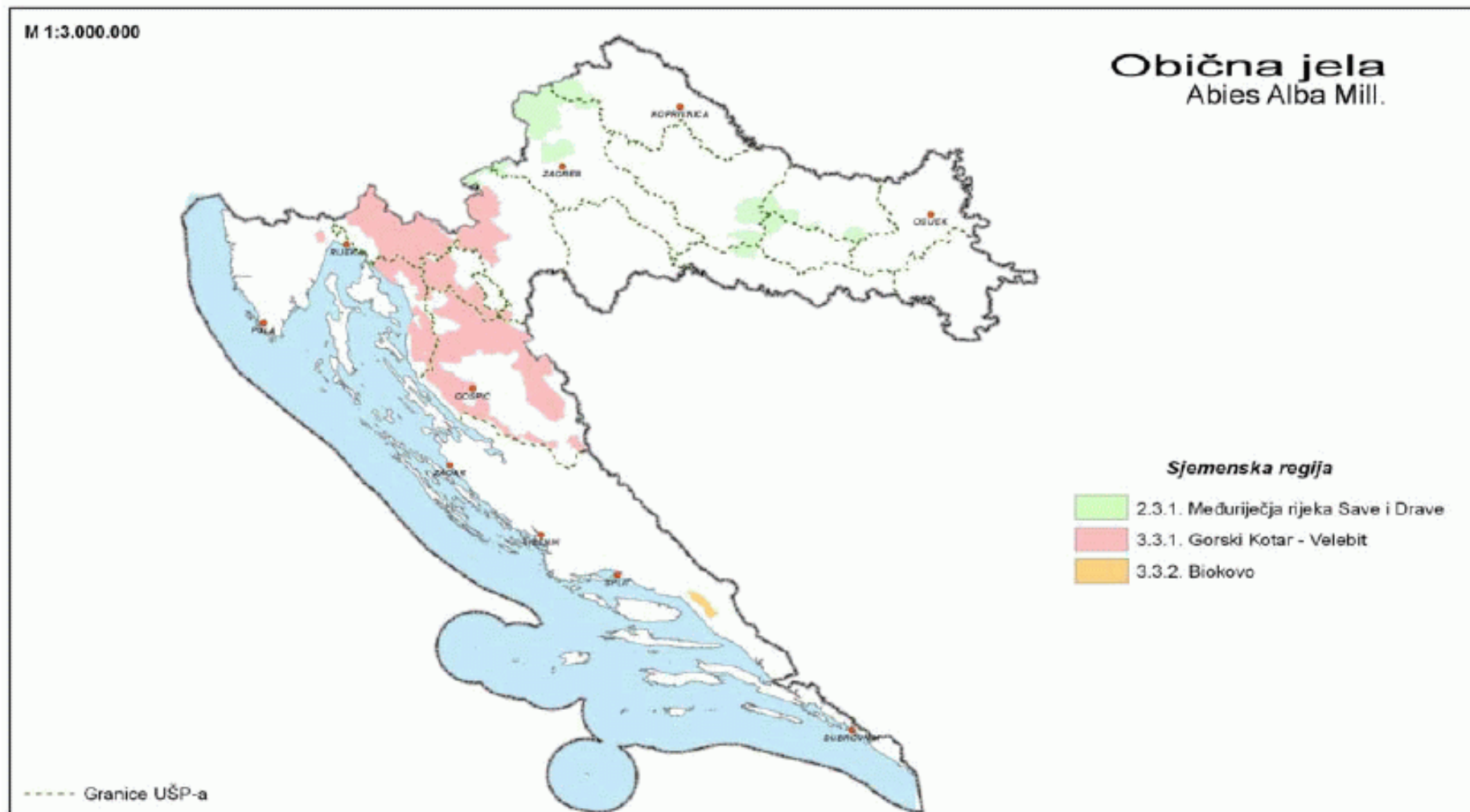
2.3.1. Jela kao predstavnik mekog drveta

Prema podacima koje su objavili Ištvančić i sur. (2008), drvena zaliha Hrvatske iznosi oko 397 963 000 m³. Crnogoričnih vrsta (četinjača) ima ukupno 12,7 %, od čega 7,9% čini jela (Slika 8). Prilikom komercijalne prerade jele nastaje određena količina drvnog otpada koji je potencijalna sirovina u biotehnološkoj proizvodnji. Stoga je važno razmotriti odgovarajuće procese predobrade, kao i biotehnološke procese u kojima bi se taj materijal mogao koristiti.

Obična jela (lat. *Abies alba* Mill.) je jedina autohtona vrsta jele u Hrvatskoj. Uz bukvu i hrast lužnjak, jela je najzastupljenije šumsko stablo na ovim prostorima (Anonimus 2, 2020). Stablo jele može narasti do 60 m. Kora je glatka u mladosti, a s vremenom potamni i popuca uzduž i poprijeko u uglaste ljuške.



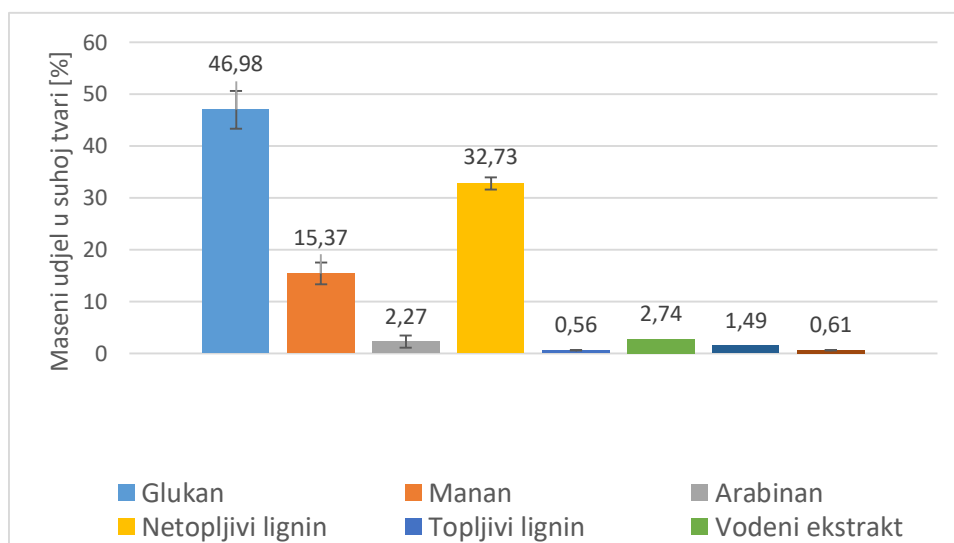
Slika 8. a) Presjek drveta jele (Anonimus 2, 2020) ; b) grančica jele (Anonimus 3, 2020).



Slika 9. Rasprostranjenost jele u Hrvatskoj (Pravilnik o područjima provenijencija svojti šumskog drveća od gospodarskog značaja, NN 107/08).

Slika 9. prikazuje rasprostranjenost jele u Hrvatskoj. Raste u područjima s dovoljno vlage i oborina. Šume jele nalazimo i u planinskim područjima gdje je klima oštrija s puno padalina (Pravilnik o područjima provenijencija svojti šumskog drveća od gospodarskog značaja, NN 107/08). Jela je vrlo osjetljiva na gradska onečišćenja zraka, vode i tla, slabo podnosi mraz i sušu te iako je česta smatra se ugroženom vrstom. Drvo jele je mekano i lako je za obradu te se koristi za izradu namještaja te kao građevinsko drvo. Njezine iglice mogu se koristiti kao čaj, a destilacijom vodenom parom proizvodi se eterično ulje koje se koristi u inhalacijama za dišne tegobe ili lokalnim tretiranjem kod bolnih mišića. Unutrašnji dio kore drva je jestiv te se može koristiti kao dodatak brašnu (Anonimus 3, 2020). Sastav jele (*Abies alba*), objavljen u Kelemen (2019), prikazan je na Slici 10. Senila i sur. (2019) također su analizirali sastav jele te objavili da udjeli celuloze, lignina i hemiceluloze iznose 42,0 %, 27,0 % odnosno 23,0 %.

Prema Kumar i sur. (2009) meko drvo ima najveći udio lignina. Među znanstvenom literaturom koja opisuje primjenu mekog drveta u biotehnologiji značajan broj radova je posvećen primjeni američke duglazije (lat. *Pseudotsuga menziesii*, engl. Douglas fir, Douglas spruce, Oregon pine) koja spada u meko drvo (Boussaid i sur., 2000; Pan i sur., 2005) i sastavom je slična jeli.



Slika 10. Sastav jelove piljevine koja sadrži prosječno 90,03 (w/w) suhe tvari (Kelemen, 2019).

Objavljeno je su da američka duglazija, analizirana uključujući i koru, sadrži 70,59 % polisaharida (od čega 64 % čine heksoze i 6,59 % pentoze), 26,10 % lignina i 3,31 % ekstraktivnih tvari (Da Silva Perez i sur., 2010). Uz glukozu (73,79 % od ukupnih polisaharida), dominantan šećer je manozna (13,62 % od ukupnih polisaharida), dok su u manjim udjelima prisutne ksiloza (7,79 %), galaktoza (3,27 %) i arabinoza (1,53 % od ukupnih polisaharida). Sličan je sastav i ostalih vrsta mekog drveta analiziranih u navedenom radu, a to su alepski bor (lat. *Pinus halepensis*, engl. Aleppo pine), crni bor (lat. *Pinus nigra*, engl. black pine), primorski bor (lat. *Pinus pinaster*, engl. maritime pine), obična smreka (lat. *Picea abies*, engl. Norway spruce), bijeli bor (lat. *Pinus sylvestris*, engl. Scots pine).

U istom su radu da Silva Perez i sur. (2010) analizirali i neke vrste tvrdog drveta, koje su sadržavale 60,16-80,41 % polisaharida (46,79-62,80 % heksoza i 10,74-19,81 % pentoza), 15,94-27,43 % lignina i 3,07-16,14 % ekstraktivnih tvari. U polisaharidima tvrdog drveta je također dominantni šećer glukoza (otprilike 70-82 %). Za razliku od polisaharida mekog drveta, koji sadrže više manoze nego ksiloze, u slučaju tvrdog drveta je obratno. Polisaharidi tvrdog drveta sadrže više ksiloze (15,09-26,14 %) nego manoze (1,50-4,40 %), dok su udjeli ostalih šećera zanemarivi (0,76-2,34 % galaktoze te 0,23-0,90 % arabinoze).

2.3.2. Predobrada mekog drveta

Prevođenjem dijela lignoceluloze u topljivi oblik proizvodi se tekući lignocelulozni hidrolizat koji nakon eventualne detoksikacije služi kao hranjiva podloga za submerzni uzgoj. Preostala čvrsta faza može se dalje tretirati nekom drugom metodom predobrade, poput enzimске hidrolize nakon koje se također koristi kao hranjiva podloga za submerzne procese ili se koristi u procesima uzgoja na čvrstom supstratu. Kao što je već ranije spomenuto, predobrada lignocelulozних sirovina je ključan korak obrade i o njejoj uspješnosti ovise sljedeći koraci proizvodnje. Mogući izvori lignocelulozних sirovina koje potječu iz šuma su otpad nastao sječom; šumski ostaci koji se sastoje od različitih vrsta drveta; kao i otpad iz proizvodnje papira. U usporedbi s otpadom koji potječe od tvrdog drveta ili poljoprivrede, meko drvo nije tako prikladno za procese biokonverzije jer se najteže hidrolizira. Biomasa mekog drveta sastoji se od oko 40-45 % (w/w) celuloze, 20-30 % (w/w) hemiceluloze i 28-30 % (w/w) lignina. Otpornost mekog drveta na enzimsku hidrolizu često se pripisuje velikom udjelu lignina i maloj veličini pora. Lignin također utječe na enzimsku hidrolizu ireverzibilnom adsorpcijom celulaza. Uz to, u mekom drvetu je manji udio acetilnih skupina koje potječu iz hemiceluloze nego u tvrdom drvetu, što može ograničiti autohidrolizu hemiceluloze, koja se pri malim pH-vrijednostima zbiva zbog octene kiseline koja se oslobađa tijekom predobrade (Palonen, 2004).

Tablica 4. Metode predobrade mekog drveta.

Metoda predobrade	Sirovina	Parametri predobrade	Rezultati predobrade	Nakon predobrade	Napomena	Izvor
Jednostupanjska obrada razrijeđenom sumpornom kiselinom (H ₂ SO ₄)	Jelova piljevina (<i>Abies alba</i>)	-180, 200, 210°C -0,5% w/v H ₂ SO ₄ -5, 10, 15 min	Hidrolizat: -2,08 g/L glukoze -7,17 g/L manoze s primjesama ksiloze i galaktoze -0,68 g/L arabinoze -0,2 g/L lignina	Rezultati preliminarnih eksperimenata su uspoređeni radi nastavka optimiranja uvjeta preobrade.	Analizirane čvrste faze sadrže 45,44-58,78 % (w/w) glukana, 36,8-49,7 % (w/w) netopljivog lignina	Kelemen, 2019
	Balzamasta jela (<i>Abies balsamea</i>) - drvo bez kore Lipa (<i>Tilia</i>) - drvo bez kore Veličina: 28,10, 20 mesh	-160, 175, 190°C -0,25-1,0 % w/v H ₂ SO ₄ miješanje 50 rpb -70 min, zagrijavanje i zadržavanje 32 min -50 g/L biomase Šaržni reaktor ukupnog volumena 1 L	Prinosi: -ksiloza 70 % -glukoza 11-13 % -ostali šećeri <50 %	Istražena je kinetika procesa i izrađeni su matematički modeli.	Prinosi ovise o vrsti sirovine. Nije uočen utjecaj dimezija čestica (28-10/20 mesh). Različite vrste biomase može se tretirati zajedno uz visoke prinose.	Yat i sur., 2008
Dvostupanjska obrada razrijeđenom sumpornom kiselinom (H ₂ SO ₄)	70 % dugoičasta jela (<i>Abies concolor</i>) 30 % žuti bor (<i>Pinus ponderosa</i>)	1.korak: -180-215 °C -0,6-2,4 % H ₂ SO ₄ -100-240 s -reaktor korisnog volumena 4 L -omjer krute i tekuće faze 1:12 2.korak: -210 °C -2,5 % H ₂ SO ₄ -100-120 s - 42-43 % suhe tvari biomase	Ukupni prinos šećera nakon: -predobrade: 65 % -enzimske hidrolize: 17 %	Provedena je simultana saharifikacija i fermentacija. Čvrsti ostatak drugog stupnja obrade pokazao je također poboljšanu enzimsku razgradivost komercijalnom celulazom.	Ukupni prinos šećera dvostupanjske obrade razrijeđenom kiselinom bio je približno 10 % veći, a neto potreba za enzimima smanjena je za oko 50 %.	Nguyen i sur., 2000

Tablica 4. (nastavak).

Metoda predobrade	Sirovina	Parametri predobrade	Rezultati predobrade	Nakon predobrade	Napomena	Izvor
Dvostupanjska obrada: razrijeđenom sumpornom kiselinom te natrijevim kloritom	Kineska jela (<i>Cunninghamia lanceolata</i>) piljevina, 20-80 mesh)	1.korak: 2,5 grama piljevine + H ₂ SO ₄ (0-0,6 % w/w), omjer čvrsto/tekuće = 1:10 w/v, temperature 130- 160 °C, vrijeme zadržavanja 60 min. 2.korak: 2 g s. tv. čvrste faze iz prvog koraka (tj. 5 % w/w s.tv. u smjesi) – obrada u blagim uvjetima (75 °C / 40 min) zakiseljenim natrijevim kloritom (koncentracije 10 % w/w NaClO ₂ , zakiseljen sa 0,1 g octene kiseline/5 g NaClO ₂)	Visoka razgradnja lignina i hemiceluloze (preko 90 %).	Blizu 100 % iskorištenja glukoze tijekom enzimske hidrolize (138,8 g/L glukoze). Slijedi fermentacija - dobiveno 64,6 g/L etanola uz iskorištenje 93,2 % (u odnosu na teorijski koeficijent konverzije) i produktivnost 5,4 g etanola/L/h.	Dobivene su do sada najveće koncentracije šećera i etanola koje su zabilježene za biomasu mekog drveta. Optimalni uvjeti 1. koraka predobrade su 160°C/0,6 % (w/w) H ₂ SO ₄ .	Ouyang i sur., 2019
Dvostupanjska obrada: Autohidroliza + delignifikacija natrijevim kloritom	Obična jela (<i>Abies alba</i>) Karakteristike sirovine nisu poznate.	Omjer suhe tvari i tekućine (eng. solid to liquid ratio, SLR 1:7. 1.korak: Autohidroliza (omjer sirovine i vode 1:7, grijanje (temperature 180 - 200 °C, vremena zadržavanja 5-15 min) 2.korak: zakiseljeni natrijev klorit (0,6 g NaClO ₂ /g biomase) u acetatnom puferu (pH 4,5) pri 75°C	Uklonjeno: -20 % celuloze -91,67 % hemiceluloze -95,41 % lignina Provedena je uspješna delignifikacija (uklonjeno je 89 % od početnog lignina) u slučaju kad su primijenjeni optimalni uvjeti prethodne autohidrolize (190 ° C/ 10 min).	Čvrsta faza korištena za SSF (38 °C/72 h): simultana enzimska saharifikacija (enzim Accellerase 1500 iz plijesni <i>Trichoderma reesei</i>) i alkoholna fermentacija.	Uz optimalne uvjete autohidrolize (190 °C/ 10 min) nakon SSF se dobiva 5,2 g etanola iz 100 g drvene biomase. Velik prinos etanola – ova metoda predobrade ima veliki potencijal.	Senila i sur., 2019
Obrada parom uz SO ₂	Američka duglazija (<i>Pseudotsuga menziesii</i>) - srž i bijel usitnjene u čips dimenzija 3 × 3 × 0,2 cm	Impregniranje sirovine sa SO ₂ , eksplozija vodenom parom (reaktor V _u = 2L) – 3 vrste uvjeta: blagi (175°C/4,5% SO ₂ /75 min), umjereni (195°C/4,5% SO ₂ /4,5 min), žešći (215°C/ 2,38% SO ₂ / 2,38 min).	Hidrolizirano 60 % celuloze Iskorištenje glukoze 18-36 % Količina lignina je ostala skoro ista.	Enzimska hidroliza: Celulaza iz plijesni <i>Trichoderma reesei</i> (Celluclast) u kombinaciji s komercijalnom β-glukozidazom Novozym 188	Srednji intenzitet eksplozije vodenom parom poboljšava enzimsku hidrolizu čvrste faze i daje veće iskorištenje šećera oslobođenih iz hemiceluloze.	Boussaid i sur., 2000

Tablica 4. (nastavak).

Metoda predobrade	Sirovina	Parametri predobrade	Rezultati predobrade	Nakon predobrade	Napomena	Izvor
Dvostupanjska obrada: eksplozija parom i alkalna obrada	Čips američke duglazije (<i>Pseudostuga menziesii</i>) 3 × 3 × 2 cm	1.korak: Eksplozija parom (195 °C/4,5 min) uz dodatak plinovitog SO ₂ (4,5 % w/w na sirovinu) 2.korak: alkalna obrada (1 % NaOH / 20 °C/72 h)	Alkalnom obradom hidrolizirano: 30,1 % lignina te 7,4 % ugljikohidrata	Kombinacija celulaze i β-glukozidaze (1:2) u acetatnom puferu (pH 4,8) na 48 °C	Prevladavajući mehanizam kojim rezidualni lignin utječe na enzimsku hidrolizu ovisi o korištenoj metodi predobrade.	Pan i sur., 2005
Mokra oksidacija	obična smreka (<i>Picea abies</i>) bez kore, mlinom čekićarom usitnjena u čips (5 mm)	Stalni uvjeti: 60 g s.tv. čipsa/L i 12 bara kisika. Varirali temperaturu (180, 200 °C), vrijeme (5, 10, 20 min) i pH-vrijednost (pH 3; 7; 10.5). Reaktor V _u = 2 L Usporedba s parnom eksplozijom pri optimalnim uvjetima (2 % SO ₂ / 215 °C / vrijeme zadržavanja 5 min)	Otopljeno 24-42 % Prinos hemiceluloze u tekućoj fazi 56 % Iskorištenje hidrolize 53 %	Smjese celulaza Celluclast 1.5 L i β-glukozidaze Novozym 188 - velik prinos enzimske hidrolize omogućavaju optimalni uvjeti prethodne mokre oksidacije (200 °C/10 min/12 bara kisika/pH 7).	Lignin iz sirovine je ostao uglavnom neotopljen. Poboljšanje enzimske hidrolize je posljedica uklanjanja hemiceluloze. Mokra oksidacija može biti alternativa obradi parnom eksplozijom.	Palonen i sur., 2004
Biološka obrada djelovanjem gljiva bijele truleži	čips 1 × 1 × 0.5 cm japanskog crvenog bora (<i>Pinus densiflora</i>) 20 godina star	50 g čipsa, 80 mL vode i 0,1 g s.tv. micelija gljiva bijelog truljena (<i>Ceriporia lacerata</i> , <i>Stereum hirsutum</i> , <i>Polyporus brumalis</i>), uzgoj (30 °C/8 tjedana)	<i>S. hirsutum</i> razgradila najviše lignina (14,52 %) i najmanje holoceluloze (7,81 %)	Iskorištenje šećera pri enzimskoj saharifikaciji povećano 21,01 % nakon obrade gljivom <i>S. hirsutum</i> u odnosu na neobrađeno drvo. (enzimi Celluclast 1,5 L i Novozyme 188)	<i>S. hirsutum</i> omogućila je najbolje rezultate enzimske saharifikacije i ima potencijal za djelotvornu biološku predobradu.	Lee i sur., 2007

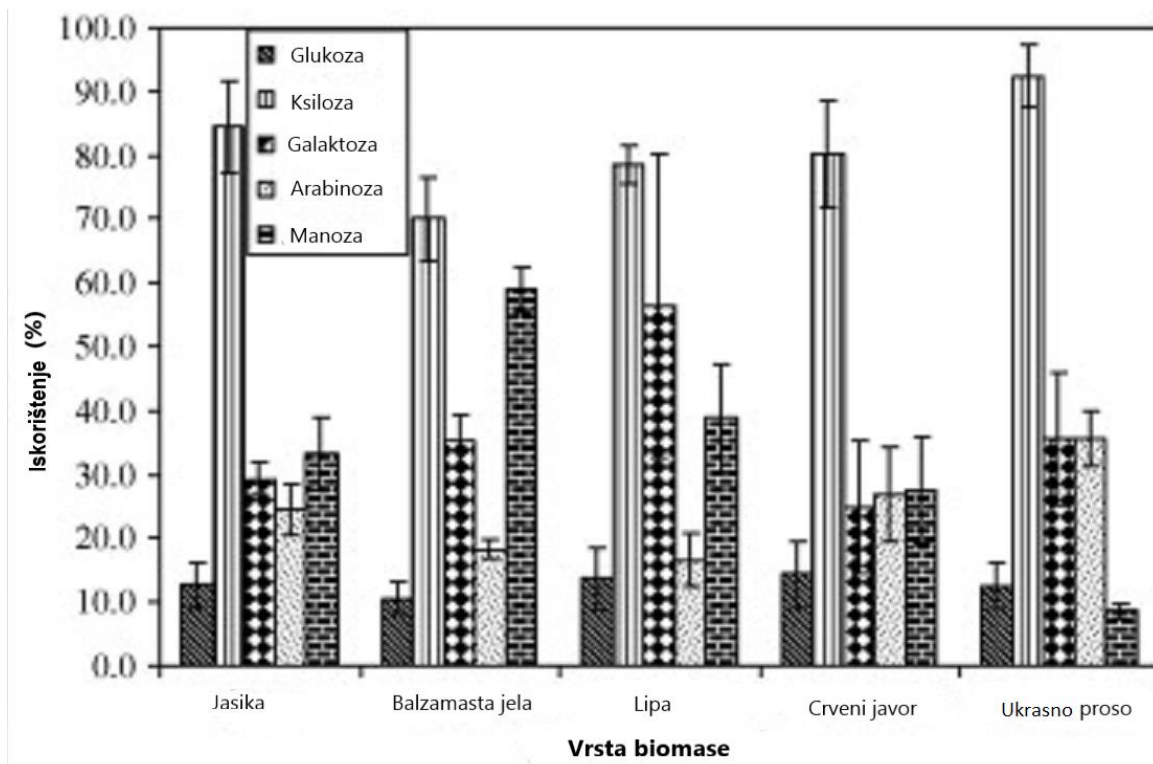
Procesi predobrade mekog drveta, prikazani u Tablici 4, međusobno se razlikuju po primijenjenim metodama i kompleksnosti. Neki od njih su jednostavni procesi koji se provode u jednom stupnju (Palonen i sur., 2004; Lee i sur., 2007; Yat i sur., 2008; Kelemen, 2019), dok se drugi provode u više faza primjenom različitih procesnih parametara (Bussaid i sur., 2000) ili kombinacijom različitih metoda predobrade (Nguyen i sur., 2000; Pan i sur., 2005; Senila i sur., 2019; Ouyang i sur., 2019). Obična jela (*Abies alba*) koristi se samo u manjem broju radova citiranih u tablici (Kelemen, 2019; Senila i sur., 2020), no za osmišljavanje procesa njezine predobrade mogu se koristiti iskustva s drugim vrstama mekog drveta sličnog sastava.

U radu Kelemen (2019) provedena je jednostupanjska predobrada jelove piljevine razrijeđenom sumpornom kiselinom (0,5 % w/v) u visokotlačnom reaktoru pri temperaturama 180, 200 i 210 °C kroz 5, 10 i 15 minuta. Kao sirovina u navedenom radu korištena je jelova piljevina s 90,03 % suhe tvari koja se sastojala od 46,98 % glukana, 15,37 % manana, 2,27 % arabinana, 32,73 % netopljivog lignina, 0,56 % topljivog lignina, 4,22 % ukupnog ekstrakta te 0,61 % pepela u suhoj tvari. Najbolji rezultati su dobiveni provođenjem kiselinske hidrolize jelove piljevine pri 180 °C uz vrijeme zadržavanja od 5 minuta, a kiselinski hidrolizat dobiven u tim uvjetima sadržavao je 9,94 g/L ukupnih šećera, koje su sačinjavale glukoza (2,08 g/L), manoza s primjesama ksiloze i galaktoze (7,17 g/L), arabinoza (0,68 g/L) te topljivi lignin (0,20 g/L). S obzirom da se iz korištene kromatografske kolone manoza, ksiloza i galaktoza eluiraju pri istom retencijskom vremenu, nije bilo moguće odrediti pojedinačne koncentracije navedenih monosaharida, stoga su one u ovom radu izražene kao koncentracije manoze s primjesama ksiloze i galaktoze. Inhibitori prisutni u hidrolizatu bili su octena kiselina (6,86 g/L), levulinska kiselina (0,03 g/L) i furani (0,24 g/L) dok mravlja kiselina nije detektirana. Na temelju ujednačenih koncentracija glukoze (2,06–2,29 g/L) u tekućim hidrolizatima dobivenim pri 180 °C za različita vremena zadržavanja (5, 10 i 15 minuta) vidljivo je da u tim uvjetima dolazi do oslobađanja glukoze iz celuloze. Autor ističe potrebu za nastavkom istraživanja u kojem bi se primijenili blaži uvjeti, tj. manja temperatura uz kraća vremena zadržavanja (160 °C, 5, 10 i 15 minuta), kako bi se smanjila razgradnja celuloze i postigla uglavnom razgradnja hemiceluloze. Pored tekućih hidrolizata, u radu je analiziran i sastav čvrste faze koja zaostaje nakon predobrade i pokazalo se da u njoj prevladavaju glukani (45,44–58,78 % w/w), što ukazuje na prisutnost celuloze, dok drugi polisaharidi nisu detektirani, a ostatak uzorka činio je uglavnom netopljivi lignin (36,8–49,7 % w/w). Također su bili prisutni i inhibitori i to octena kiselina (4,20–8,35 % w/w), mravlja kiselina (0,68–7,03 % w/w) i levulinska kiselina (maksimalno 1,28 % w/w).

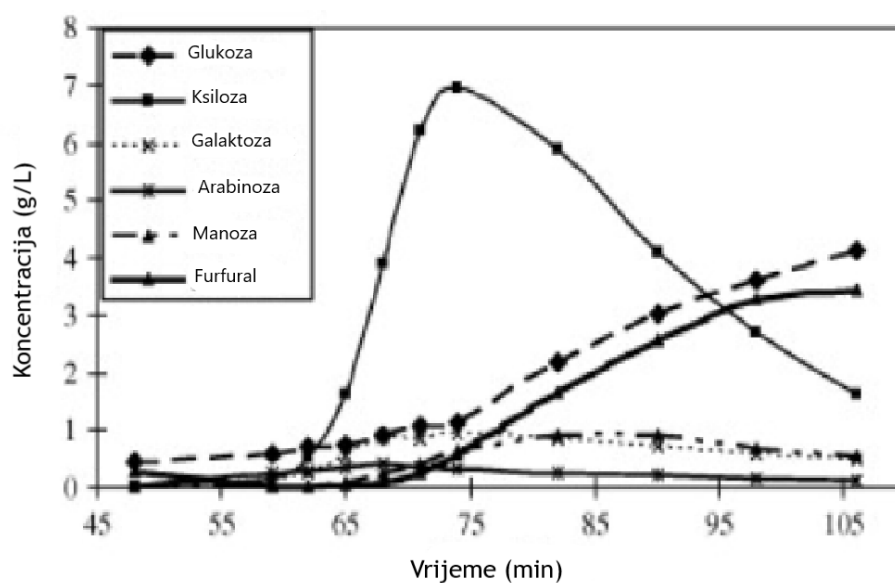
Biorafinerije se dizajniraju za preradu specifičnih sirovina, kao što su kukuruz, ukrasno proso ili druge energetske kulture i sirovine šumskog porijekla. U šumskim predjelima, sirovina za biorafinerije najvjerojatnije neće biti porijeklom od jedne biljke (monokulture), već će to biti mješavina lokalno uzgojenih drvnih vrsta, koje također mogu biti pomiješane s biomasom zeljastih biljaka. Fleksibilne tehnologije predobrade koje se mogu primijeniti za biomasu različitog sastava (različitih udjela celuloze, hemiceluloze i lignina) smatraju se najučinkovitijima. Stoga su Yat i sur. (2008) pokušali pronaći metodu primjenjivu za preradu mješavina različitih biomasa uz postizanje visokih prinosa za svaku sirovinu.

Yat i sur. (2008) primijenili su jednostupanjsku predobradu razrijeđenom sumpornom kiselinom (Tablica 4) te izradili odgovarajuće matematičke modele koji opisuju proces. Pritom su usporedili rezultate obrade ukrasnog prosa i četiri vrsta drveta, od čega su dvije spadale u meko drvo - balzamasta jela (*Abies balsamea*) i lipa (*Tilia*). Glavne komponente ovih sirovina bile su ksilan, glukan, i lignin. Istraživanje je provedeno u šaržnom reaktoru ukupnog volumena 1 L pri koncentracijama sumporne kiseline 0,25–1,0 % (w/v), temperaturama 160–190 °C i uz veličinu čestice sirovine 28, 10 odnosno 20 mesh. Brzine oslobađanja ksiloze iz hemiceluloze i nastajanja furfurala iz ksiloze izrazito su ovisile i o temperaturi i o koncentraciji kiseline. Međutim nije primijećeno da različite dimenzija čestica sirovine (28, 10 odnosno 20 mesh) imaju utjecaja na rezultate predobrade. Oligomerni šećeri, oslobođeni djelomičnom hidrolizom, opaženi su u ranijoj fazi procesa za sve šećere (ksilozu, glukozu, arabinozu, manozu i galaktozu), ali su u kasnijim fazama procesa koncentracije oligomera značajno smanjene zbog veće razgradnje hemiceluloze. Maksimalni prinosi za ksilozu kretali su se od 70 % (balzamasta jela) do 94 % (ukrasno proso), za glukozu od 10,6 % do 13,6 %, a za ostale manje zastupljene šećere od 8,6 % do 58,9 %. Prinosi su bili zadovoljavajući za sve sirovine (Slika 11). Jedina iznimka je balzamasta jela čiji su prinosi niži od ostalih. Uočeno je da razgradnja ksiloze skoro linearno ovisi o koncentraciji kiseline.

U vremenu reakcije kada je oslobođena maksimalna koncentracija ksiloze, prisutna koncentracija oligomera već je pala u odnosu na njihovu maksimalnu koncentraciju oligomera. Maksimalna koncentracija ksiloze postignuta je prije značajnog nakupljanja furfurala (Slika 12). Stoga je potrebna pažljiva kontrola temperature reaktora i vremena zadržavanja kako bi se optimizirala koncentracija monomera i smanjilo stvaranje nefermentabilnih nusproizvoda hidrolize. Rezultati koje su objavili Yat i sur. (2008) značajni su i zbog toga što ukazuju da se mješavine različitih vrsta biomase mogu zajedno prerađivati i da se pritom i dalje postižu visoki prinosi za sve vrste biomase. Međutim, ovi autori također navode da prethodno treba istražiti interakcije među sirovinama.



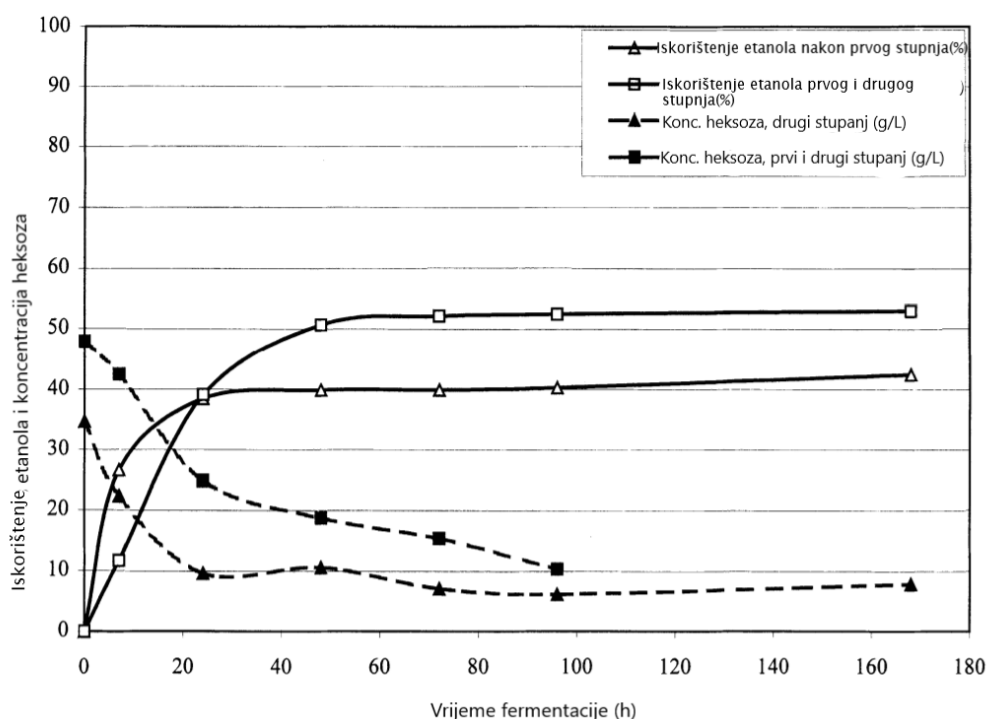
Slika 11. Ukupna iskorištenja šećera raznih vrsta biomase (Yat i sur., 2008).



Slika 12. Koncentracije monosaharida i furfurala tijekom kiseline hidrolize lipovog drveta (20–10 mesh) razrijeđenom sumpornom kiselinom (0,5 % w/v), temperatura zadržavanja 175 °C (Yat i sur., 2008).

Jednostupanjsku i dvostupanjsku obradu mekog drveta razrijeđenom sumpornom kiselinom u kombinaciji s kasnijom simultanom enzimskom saharifikacijom i alkoholnom fermentacijom istraživali su Nguyen i sur. (2000). Rezidualna celuloza u čvrstoj fazi nakon dvostupanjske hidrolize može biti otporna na djelovanje enzima. Stoga je cilj ovog istraživanja bilo pronalaženje optimalnih uvjeta jednostupanjske i dvostupanjske hidrolize razrijeđenom sumpornom kiselinom, pri kojima se postiže maksimalno iskorištenje monosaharida iz mekog drveta dobivenog prorjeđivanjem šume. Kao sirovina je korištena mješavina dviju vrsta mekog drveta koja je sadržavala 70 % dugoičaste jele (zvane još i koloradska jela, *Abies concolor*) i 30 % žutog bora (*Pinus ponderosa*). Navedeno istraživanje provedeno je kao nastavak ranijih eksperimenata kako bi se povećalo iskorištenje druge faze procesa tj. iskorištenje glukoze oslobođene iz celuloze preostale u čvrstoj fazi nakon prvog stupnja kiselinske hidrolize. Cijela stabla su usitnjena u čips pomoću reznog mlina (izlazno sito 12,7 mm). Dobiveni čips je zatim impregniran razrijeđenom sumpornom kiselinom, a maseni omjer tekućine (uključujući vodu u izvornom čipsu) i suhog drveta iznosio je oko 12:1. Suha tvar mješovite sirovine natopljene kiselinom sadržavala je 34,9 % lignina, 39,9 % glukana, 10,4 % manana, 6,0 % ksilana, 2,7 % galaktana, <0,1 % arabinana te 0,3 % pepela i 5,7 % neidentificiranih spojeva. Slijedila je obrada parnom eksplozijom u malom mjerilu pri čemu je suha tvar sirovine impregnirane sumpornom kiselinom iznosila 42-43 %. U jednostupanjskoj predobradi, sirovina je tretirana pri širokom rasponu uvjeta (temperature 180-215 °C, koncentracije H₂SO₄ kojom je natopljena biomasa 0,6 - 2,4 % w/w te vremena zadržavanja 100-240 sekundi). U dvostupanjskoj predobradi, prva faza provedena je s pri blažim uvjetima kako bi se postiglo maksimalno iskorištenje hemiceluloze. Šećeri prevedeni u vodotopljivi oblik dobiveni su u hidrolizatu prvog stupnja. Čvrsta faza (uglavnom celuloza) dobivena u prvom stupnju hidrolize, izdvojena je od hidrolizata. Potom je korištena u drugom stupnju tako da je prvo impregnirana razrijeđenom sumpornom kiselinom, a zatim tretirana parom (temperatura 210 °C, koncentracija H₂SO₄ kojom je natopljena biomasa 2,5 % i vrijeme zadržavanja 100–120 sekundi) u žešćim uvjetima od onih koji su primijenjeni u prvom stupnju obrade. Time se željelo dio preostale celuloze hidrolizirati u glukozu, a čvrsti ostatak drugog stupnja obrade pokazao je također poboljšanu enzimsku digestibilnost s komercijalnom celulazom. Usporedba efikasnosti uklanjanja ugljikohidrata i lignina iz lignoceluloznih materijala pri različitim uvjetima i postupcima kiselinske predobrade pojednostavljena je primjenom pojma intenziteta procesa, koji uzima u obzir vrijeme, temperaturu i koncentraciju kiseline. Tako su Nguyen i sur. (2000) primjenom koncepta kombiniranog intenziteta (engl. combined severity, CS) dokazali da se ukupni prinos šećera iz mekog drveta može poboljšati dvostupanjskim postupkom predobrade, pri čemu su u prvom stupnju kiselinske hidrolize koristili nešto blaže uvjete nego u drugom. Ukupni prinos

šećera iz dvostupanjske obrade razrijeđenom kiselinom bio je približno 10 % veći nego za jednostupanjski proces, a neto potreba za enzimima smanjena je za oko 50 %. Odabirom relativno slabog intenziteta u drugom stupnju predobrade može se poboljšati enzimska razgradivost, a samim time povećati prinos etanola, uz istovremeno značajno smanjenje potrebe za enzimima. Zato je dvostupanjski postupak predobrade povoljniji od jednostupanjskog. SSF kombiniranog hidrolizata prvog i drugog stupnja uspješno je proveden u prisutnosti velike koncentracije suhe tvari i bez potrebe za detoksikacijom, a pritom je korišten soj kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koji je tijekom ranijih istraživanja adaptiran na inhibitore. Prinos etanola bio je veći za oko 5 % u odnosu na hidrolizat nakon samo dvostupanjske obrade (Slika 13).



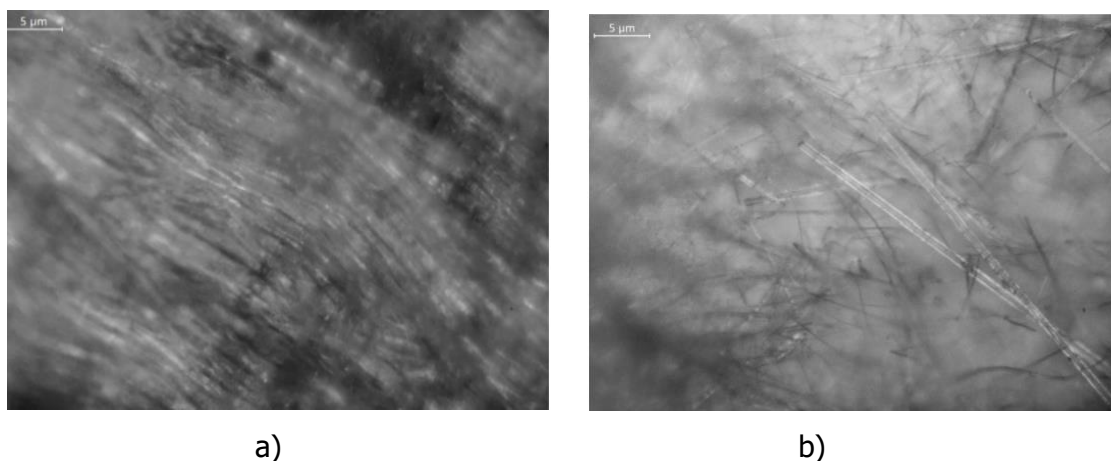
Slika 13. Simultana saharifikacija i fermentacija lignoceluloznog hidrolizata pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* pri sobnoj temperaturi (Nguyen i sur., 2000).

Kineska jela (*Cunninghamia lanceolata*) je brzorastuća crnogorična vrsta s visokim prinosima drveta izvrsne kvalitete, a rasprostranjena je širom južne Kine. To je trenutno jedna od najvažnijih vrsta za proizvodnju drveta u Kini. Stoga preradom kineske jele nastaje i obilje piljevine koju su Ouyang i sur. (2019) istraživali kao potencijalnu sirovinu za proizvodnju bioetanola (Tablica 4). Provedena je dvostupanjska obrada razrijeđenom sumpornom kiselinom i zakiseljenim natrijevim kloritom, kako bi se poboljšala kasnija enzimska razgradnja čvrstog ostatka i provela alkoholna fermentacija u laboratorijskom mjerilu. Autori navode da se radi o prvoj objavljenoj primjeni ove metode za meko drvo. Glavna prednost primjene

natrijevog klorita u kiseloj otopini je visoka selektivnost oksidacije lignina, pri čemu ne dolazi do značajnog gubitka ugljikohidrata. Istraživani su različiti parametri procesa predobrade i njihov utjecaj na prinos saharifikacije. Predobrada razrijeđenom sumpornom kiselinom uklonila je veću količinu hemiceluloze, a potom je obrada natrijevim kloritom omogućila izuzetno uspješnu delignifikaciju. U optimalnim uvjetima dobivena je čvrsta faza bogata celulozom (76,8 % celuloze i 8,4 % lignina) u kojoj se celuloza može uspješno enzimski razgraditi, uz iskorištenje blizu 100 % tijekom 48 sati). Štoviše, šaržnom enzimskom hidrolizom oslobođeno je čak 138,8 g/L glukoze, a alkoholnom fermentacijom proizvedeno je 64,6 g/L etanola te autori navode da su navedene vrijednosti dosad najviše zabilježene za oslobođenu glukozu i proizvedenu koncentraciju etanola iz biomase mekog drveta. Ovi rezultati sugeriraju da se enzimska hidroliza, a time i proizvodnja bioetanola, iz piljevine kineske jele mogu značajno poboljšati zahvaljujući simultanom uklanjanju hemiceluloze i lignina koje se postiže primjenom opisane metode predobrade. U rasponu istraženih temperatura, maksimalan prinos enzimske hidrolize postignut je u slučajevima kad je prvi korak predobrade, koji uključuje razrijeđenu sumpornu kiselinu, proveden pri 160 °C. Na temelju podataka koje su objavili Ouyang i sur. (2019), mogu se provesti slične predobrade drugih vrsta mekog drveta, poput jele dostupne u našim krajevima, te istražiti utjecaj biljne vrste i sastava na rezultate predobrade.

Senila i sur. (2020) istraživali su proizvodnju bioetanola iz drveta obične jele (*Abies alba*), ali karakteristike sirovine nisu poznate jer kemijski sastav i dimenzije nisu navedeni u radu. Primijenjeni postupak predobrade sastoji se od kombinacije autohidrolize i delignifikacije drveta natrijevim kloritom (NaClO_2), a potom se čvrsta faza koristila za simultanu saharifikaciju i fermentaciju (38 °C/ 72 h) (Tablica 4). Posljednjih godina posebna pažnja posvećena je razvoju ekološki prihvatljivih metoda za proizvodnju bioetanola. Autohidroliza koristi samo vodu za ekstrakciju hemicelulozne frakcije kao smjese oligosaharida, monosaharida i sekundarnih nusproizvoda pa je udio celuloze bio znatno veći nakon autohidrolize. Nakon autohidrolize je čvrsta faza delignificirana zakiseljenim natrijevim kloritom u skladu s prethodnim radom istih autora. Time se razbijaju vodikove veze između celuloze i lignina nakon čega drvo sadrži pojedinačna mikrocelulozna vlakna. Provedena je uspješna delignifikacija (uklonjeno je 89 % od početnog lignina) u slučaju kad su primijenjeni optimalni uvjeti prethodne autohidrolize (190 °C/ vrijeme zadržavanja 10 minuta). Dva su mehanizma utjecaja lignina na naknadnu hidrolizu mekog drveta: neke komponente lignina stvaraju fizičke barijere koje ometaju ili sprječavaju djelovanje celulaza; drugi uzrokuju nespecifično vezivanje celulaza. Tijekom provedenih postupaka predobrade dogodile su se jasno uočljive morfološke promjene čvrste faze (Slika 14). Dobiven je veliki prinos etanola i ova metoda ima veliki potencijal za upotrebu u biorafinerijama. Maksimalna masena koncentracija bioetanola (52,0 g/L) dobivena

je pri optimalnim uvjetima ovog kombiniranog procesa (autohidroliza-delignifikacija-SSF), tj. od 100 g suhe tvari jelovine koja je sadržavala 42 g celuloze (tj. 42 % od suhe tvari) može se dobiti 5,2 g bioetanola.



Slika 14. Mikroskopske slike a) neobrađenog, b) delignificiranog drveta obične jele pod povećanjem 20× (Senila i sur., 2020).

Tablica 5. Udio šećera (hidratizirani oblik) i lignina u izvornoj bjeli i srži duglazije (Boussaid i sur., 2000).

Šećeri (g/ 100 g suhe tvari)	Bijel	Srž
Glukoza	48,3	49,4
Manoza	13,2	14,0
Galaktoza	3,6	4,2
Ksiloz	2,3	3,0
Arabinoza	1,2	1,2
Lignin netopljiv u kiselini	29,1	30,9
Ukupno	97,7	102,7

Boussaid i sur. (2000) su primijenili metodu eksplozije vodenom parom za obradu američke duglazije (*Pseudotsuga menziesii*). Cilj njihovog istraživanja bio je pronaći optimalne uvjete predobrade te utvrditi ima li razlike između obrade različitih frakcija drveta (srži i bjelike) pri blagim, umjerenim, i žešćim uvjetima (Tablica 4). Prije obrade, kemijski sastav srži i bjelike bio je prilično sličan (oko 30 % lignina, 49 % glukoze, 13 % manoze, 2% ksiloze, 1,2 % arabinoze) (Tablica 5). Vodikov ion (H^+), nastao reakcijom između SO_2 i vode prilikom predobrade parnom eksplozijom, katalizira hidrolizu glikozidnih veza u polisaharidima drveta. Zbog svoje ekstremno male veličine (4 \AA), vodikovi ioni mogu lako prodrijeti u strukturu celuloze i hidrolizirati je u glukozu. Intenzitet uvjeta predobrade izravno utječe na uspješnost kasnije enzimske hidrolize srži i bjelike. Povećanje brzine i prinosa enzimske hidrolize, koje je bilo rezultat jačeg intenziteta prethodne obrade, uzrokovano je kemijskim i strukturnim promjenama srži i bjelike. Te promjene uključuju otapanje hemiceluloze i moguće smanjenje veličine čestica sirovine. Pri određenom intenzitetu obrade, frakcija bjelike bila je osjetljivija na kiselinski kataliziranu parnu predobradu pa je dobivena čvrsta faza imala bolju enzimsku razgradivost. Čvrsta faza dobivena primjenom slabog intenziteta predobrade nije dovoljno podložna enzimskoj razgradnji, a tretman jakog intenziteta uzrokovao je pretjerani gubitak šećera oslobođenih iz hemiceluloze. U uvjetima srednjeg intenziteta postignut je dobar kompromis između ovih dviju krajnosti (tj. efekata jakog i slabog intenziteta predobrade) i time je poboljšana enzimska hidroliza krutine i veće je iskorištenje šećera oslobođenih iz hemiceluloze.

Pan i sur. (2005) proveli su obradu američke duglazije kombinacijom eksplozije vodenom parom i alkalnog postupka (Tablica 4). Pretpostavlja se da je lužinom pri sobnoj temperaturi ekstrahiran materijal koji predstavlja fizičku barijeru enzimima do komponenata celuloze. Da bi se razjasnio mehanizam putem kojeg lignin ometa djelovanje enzima, cilj ove studije bio je ispitati učinak djelomične delignifikacije, koja se postiže kombinacijom parne eksplozije i obradom razrijeđenom lužinom, na enzimsku hidrolizu celulozama. Predobrada duglazije parnom eksplozijom daje čvrsti ostatak koji sadrži približno 43 % lignina. Ekstrakcija hladnim natrijevim hidroksidom (1 % NaOH) smanjila je udio lignina za samo približno 7 %, ali je konverzija celuloze u glukozu poboljšana za oko 30 %. Dobiveni rezultati podupiru hipotezu da lignin, koji nije uklonjen predobradom mekog drveta, utječe na kasniju enzimsku hidrolizu celuloze tako da neke komponente lignina predstavljaju fizičku barijeru koja sprječava napad celuloza, dok druge neproduktivno vežu celuloze. Autori smatraju da se važnost ovih mehanizama razlikuje, ovisno o režimu prethodne pripreme materijala. Također naglašavaju da je prije primjene ovog postupka u industrijskim procesima potrebna dodatna tehnnoekonomska analiza.

Palonen i sur. (2004) proveli su mokru oksidaciju obične smreke (*Picea abies*) uz naknadnu enzimsku hidrolizu. Pritom su pokušali istražiti utjecaj lignina i hemiceluloze na enzimsku hidrolizu. Utvrđen je kemijski sastav čvrste frakcije nakon različitih uvjeta predobrade mokrom oksidacijom te analiziran sastav tekuće frakcije. Potom je provedena enzimska konverzija čvrste frakcije dobivene mokrom oksidacijom pri čemu je uspoređena učinkovitost dva komercijalna pripravka celuloze (Celluclast i Multifect). Uz to je napravljena usporedba kombinacije mokra oksidacija-enzimska hidroliza s uobičajenom predobrdom (kombinacija parna eksplozija-enzimska hidroliza). Na temelju rezultata ranijih eksperimenata s pšeničnom slamom, provedeno je istraživanje različitih kombinacija uvjeta mokre oksidacije čipsa smreke. Pritom su koncentracija suhe tvari i tlak kisika bili konstantni, uz različite temperature, pH-vrijednosti i vremena zadržavanja (Tablica 4). Udio celuloze u čvrstoj fazi nakon obrade povećan je otapanjem hemiceluloze i djelomično lignina. Suha tvar neobrađene smrekovine sadržavala je 47 % (w/w) glukoze, a nakon obrade pri različitim uvjetima udio glukoze u suhoj tvari čvrste faze iznosio je 61,7-72,2 % (w/w), što je značajno više nego u usporedbi s parnom eksplozijom (45 % w/w). Prinosi hemiceluloze i celuloze bili su najmanji primjenom manje pH-vrijednosti, velike temperature i dužeg vremena zadržavanja. Pretpostavlja se da su se šećeri razgradili na druge produkte zbog ekstremnih uvjeta. Provedena serija eksperimenata predobrade dala je informacije o ulozi lignina i hemiceluloze u enzimskoj hidrolizi. Temperatura predobrade, ostatak hemiceluloze u predobrađenoj sirovini i vrsta korištenog komercijalnog pripravka celuloze su najvažniji čimbenici koji utječu na enzimsku hidrolizu. Nakon trodnevne hidrolize čvrstog ostatka dobivenog uz optimalne uvjete mokre oksidacije (200 °C/ 10 minuta / pH 7 / 12 bara kisika), dobiveno je najveće iskorištenje šećera, koje je iznosilo 79 % od teorijskog. Autori smatraju da je mokra oksidacija atraktivna alternativa metodama koje su ranije više istraživane (npr. hidrolizi razrijeđenom kiselinom i predobradi parom). Uvjeti mokre oksidacije koji su optimalni za kasniju enzimsku hidrolizu osigurali su velik prinos enzimske hidrolize, kao i brzu filtraciju nakon predobrade. Lignin u sirovini ostao je uglavnom netopljiv, te je stoga dostupan za proizvodnju energije spaljivanjem. Ranije se smatralo da bi ova metoda predobrade mogla biti posebno prikladna za uklanjanje lignina, ali prema ovom istraživanju, poboljšanje enzimske hidrolize je posljedica uklanjanja hemiceluloze. Stoga je uloga rezidualne hemiceluloze očito važna. Dodavanjem enzima koji hidroliziraju zaostalu hemicelulozu mogao bi se dobiti povećani prinos fermentabilnih šećera. U ovom radu je objavljeno veliko ukupno iskorištenje ugljikohidrata, a autori naglašavaju da je ubuduće potrebno poboljšati enzimsku hidrolizu celuloze i hemiceluloze.

Lee i sur. (2007) (Tablica 4) proveli su biološku obradu japanskog crvenog bora (*Pinus densiflora*) pomoću tri gljive bijele truleži koje su odabrane su zbog učinkovite razgradnje

lignina i njemu sličnih spojeva, a to su *Stereum hirsutum* (hrv. dlakava pločica), *Polyporus brumalis* (hrv. zimski rupičar) i *Ceriporia lacerata* (hrvatski naziv nije pronađen). Razgradnja lignina gljivama bijele truleži odvija se djelovanjem enzima kao što su peroksidaze i lakaze, a nastajanje ovih enzima je regulirano izvorima ugljika i dušika. Praćene su promjene kemijskog sastava i strukture sirovine te je uspoređena podložnost enzimskoj saharifikaciji početne sirovine i drveta koje je djelomično razgrađeno djelovanjem gljivama bijele truleži. Od navedene tri gljive, *S. hirsutum* je selektivno razgradio lignin japanskog crvenog bora, ali ne i holocelulozu (pojam koji se koristi zajednički za hemicelulozu i celulozu). Nakon osam tjedana predobrade gljivom *S. hirsutum*, ukupni gubitak mase iznosio je 10,7 %, dok je gubitak lignina bio najveći među testiranim uzorcima i iznosio 14,52 % (Tablica 6). Za enzimsku saharifikaciju treba odabrati gljive na temelju njihove sposobnosti razgradnje lignina s minimalnim učincima na celulozu. Smanjenje udjela holoceluloze postignuto djelovanjem gljive *S. hirsutum* iznosilo je 7,81 %, slično je bilo kao kod gljive *C. lacerata* (8,0 %), dok je kod gljive *P. brumalis* iznosilo 10,6 %. Ekstracelularni enzimi gljive *S. hirsutum* pokazali su veću aktivnost ligninaze i manju aktivnost celulaze nego kod ostalih dviju gljiva. Može se zaključiti da su ukupni gubitak mase i promjene kemijskog sastava japanskog crvenog bora djelovanjem ovih gljiva u korelaciji s aktivnostima enzima koji razgrađuju lignin i celulozu. Na temelju podataka dobivenih fizikalnom karakterizacijom djelomično razgrađenog materijala i veličine pora, zaključeno je da gljiva *S. hirsutum* ima potencijal za djelotvornu biološku predobradu. Povećanje dostupne veličine pora od preko 120 nm, koje je ostvareno gljivom *S. hirsutum*, omogućilo je pristup enzimima za daljnju enzimsku saharifikaciju. Nakon tretmana čipsa japanskog crvenog bora gljivom *S. hirsutum* provedena je enzimska saharifikacija komercijalnim enzimima (Cellulclast 1,5 L i Novozyme 188), pri čemu je iskorištenje šećera uvelike povećano u odnosu na neobrađene kontrolne uzorke drveta i iznosio je 21,01 %. Ovo ukazuje da gljiva bijele truleži *S. hirsutum* pruža mogućnost povećanja prinosa šećera iz drvne biomase.

Tablica 6. Gubitak mase i promjene u kemijskoj strukturi japanskog crvenog bora nakon obrade gljivama bijelog truljenja (Lee i sur., 2007).

Gljiva bijelog truljenja	Gubitak mase (%)	Razgradnja lignina (%)	Razgradnja holoceluloze (%)
<i>C. lacerata</i>	9,5 ± 0,5	13,1 ± 0,4	8,0 ± 0,5
<i>P. brumalis</i>	9,9 ± 0,4	11,6 ± 0,3	10,6 ± 0,3
<i>S. hirsutum</i>	10,7 ± 0,7	14,5 ± 0,4	7,8 ± 0,3

3. ZAKLJUČAK

Na temelju iznesenih činjenica u teorijskom dijelu doneseni su sljedeći zaključci:

1. Predobrada je ključan korak u cjelokupnom procesu konverzije lignoceluloznih sirovina u biotehnoške proizvode te o njoj uspješnosti ovise kasnije faze proizvodnje. Uvjete predobrade je potrebno optimirati u skladu s karakteristikama pojedine sirovine i željenog bioprocesa kako bi se postiglo zadovoljavajuće oslobađanje fermentabilnih šećera uz minimalno nastajanje toksičnih spojeva.
2. Predobrada obične jele (*Abies alba*) opisana je samo u manjem broju dostupnih znanstvenih radova, no za osmišljavanje procesa njezine predobrade mogu se koristiti podaci dobiveni u istraživanjima drugih vrsta mekog drveta sličnog sastava.
3. Procesi predobrade mekog drveta međusobno se razlikuju po primijenjenim metodama i kompleksnosti, a u literaturi su opisane kemijske, fizikalno-kemijske i biološke metode predobrade.
4. Pored jednostavnih jednostupanjskih procesa, u dostupnoj literaturi je opisana predobrada mekog drveta pomoću dvostupanjskih procesa (pri čemu se čvrsta faza iz prvog koraka tretira u drugom koraku procesa) ili složenijih procesa (dvostupanjska fizikalno-kemijska obrada u kombinaciji s naknadnom enzimskom obradom ili simultanom enzimskom saharifikacijom i fermentacijom).
5. Dvostupanjskom fizikalno-kemijskom obradom mogu se povećati prinosi šećera u lignoceluloznim hidrolizatima u odnosu na prinose postignute u jednostupanjskim postupcima. Primjenom dvostupanjske fizikalno-kemijske obrade također se može značajno smanjiti potrebna količina enzima za kasniju hidrolizu čvrstog ostatka.
6. Proces predobrade može se optimirati tako da omogućava istovremenu obradu više različitih sirovina, uz postizanje velikih prinosa za svaku korištenu sirovinu i smanjenje ukupnih troškova. To je važno zato što se u realnim uvjetima biotehnoške proizvodnje može istodobno koristiti više vrsta lignocelulozne biomase, koje su različitog sastava i karakteristika te potječu iz različitih izvora.

4. LITERATURA

- Alizadeh H., Teymouri F., Gilbert, T. I., Dale B. E. (2005). Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied biochemistry and biotechnology*, **124**(1-3): 1133-1141.
- Almeida A. C., Gomes T., Langford K., Thomas K. V., Tollefsen K. E. (2017). Oxidative stress in the algae *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to biocides. *Aquatic toxicology*, **189**: 50-59.
- Alriksson B. (2006). *Ethanol from lignocellulose: Alkali detoxification of dilute-acid spruce hydrolysates*. (Doctoral dissertation, Karlstad University).
- Andlar M., Rezić T., Marđetko N., Kracher D., Ludwig R., Šantek B. (2018). Lignocellulose degradation: an overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, **18**(11): 768-778.
- Anonimus 1 (2020) Dlakava pločica <<https://www.first-nature.com/fungi/stereum-hirsutum.php>> Pristupljeno 27. kolovoza 2020.
- Anonimus 2 (2020) Presjek drveta jele <<https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=16354>> Pristupljeno 13. lipnja 2020.
- Anonimus 3 (2020) Grančica jele <<https://www.plantea.com.hr/obicna-jela/>> Pristupljeno 13. kolovoza 2020.
- Bajpai P. (2016). Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production. *Briefs in green chemistry for sustainability*, Springer str. 87.
- Ballesteros I., Negro M. J., Oliva J. M., Cabañas A., Manzanares P., Ballesteros M. (2006). Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. U: *Twenty-seventh symposium on biotechnology for fuels and chemicals*. Humana Press, str. 496-508.
- Bamdad H., Hawboldt K., MacQuarrie S. (2018). A review on common adsorbents for acid gases removal: focus on biochar. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **81**: 1705-1720.
- Bellido C., Bolado S., Coca M., Lucas S., González-Benito G., García-Cubero M. T. (2011). Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource technology*, **102**(23): 10868-10874.
- Bocek A. M. (2003). Effect of hydrogen bonding on cellulose solubility in aqueous and nonaqueous solvents. *Russian Journal of Applied Chemistry*, **76**(11): 1711-1719.
- Boussaid A. L., Esteghlalian A. R., Gregg D. J., Lee K. H., Saddler J. N. (2000). Steam pretreatment of Douglas-fir wood chips. U: *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* Humana Press, Totowa, NJ, str. 693-705.
- Brodeur G., Yau E., Badal K., Collier J., Ramachandran K. B., Ramakrishnan S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme research*, **2011**: 787532. 17 str.

- Chandel A. K., da Silva S. S., Singh O. V. (2011). Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. *Biofuel production-recent developments and prospects*, **10**: 225-246
- Chang V. S., Holtzapple M. T. (2000). Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. U: *Twenty-first symposium on biotechnology for fuels and chemicals* (str. 5-37). Humana Press, Totowa, NJ.
- Chen H. (2015). Lignocellulose biorefinery engineering: principles and applications. Woodhead Publishing, Cambridge 2015, **74**: 1-17
- Chen Y., Sharma-Shivappa R. R., Keshwani D., Chen C. (2007). Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Applied biochemistry and biotechnology*, **142**(3): 276-290.
- da Costa Sousa L., Chundawat S. P., Balan V., Dale B. E. (2009). 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Current opinion in biotechnology*, **20**(3): 339-347.
- da Silva Perez D. , Guillemain A., Berthelot A. (2010). Evaluation of forestry biomass quality for the production of second-generation biofuels. *Cellulose Chemistry and Technology*, **44**: 1-14.
- Harmsen P. F. H., Huijgen W., Bermudez L., Bakker R. (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. Report number: ECN-E—10-013. Wageningen UR-Food & Biobased Research, 27-28.
- Hatfield R., Vermerris W. (2001). Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant physiology*, **126**(4): 1351-1357.
- Hrvatska enciklopedija (2020a) listače. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=36787>> 2020. Pristupljeno 23. 8. 2020.
- Hrvatska enciklopedija, (2020b) četinjače. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=13334>> 2020. Pristupljeno 23. 8. 2020.
- Hu R., Lin L., Liu T., Liu, S. (2010). Dilute sulfuric acid hydrolysis of sugar maple wood extract at atmospheric pressure. *Bioresource technology*, **101**(10): 3586-3594.
- Ištvančić J., Antonović A., Pervan S., Jambrečić V., Benković Z., Kavran M. (2008). Pílanarstvo u Republici Hrvatskoj II. dio–Hrvatsko pílancarstvo u novom tisućljeću. *Drvna industrija: Znanstveni časopis za pitanja drvne tehnologije*, **59**(4): 169-180.
- Karimi K., Shafiei M., Kumar R. (2013). Progress in physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. U: *Biofuel technologies*, Springer, Berlin, Heidelberg, str. 53-96.
- Kelemen Z. (2019). Predobrada jelove piljevine razrijeđenom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru. *Završni rad*, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet.
- Kulkarni Vishakha S., Butte Kishor D., Rathod Sudha S. (2012). Natural polymers – A comprehensive review. *International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences*, **3**(4): 1597-1613.

- Kumar P., Barrett D. M., Delwiche M. J., Stroeve P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & engineering chemistry research*, **48**(8): 3713-3729.
- Lee J. W., Gwak K. S., Park J. Y., Park M. J., Choi D. H., Kwon M., Choi I. G. (2007). Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *The Journal of Microbiology*, **45**(6): 485-491.
- Maurya D. P., Singla A., Negi S. (2015). An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*, **5**(5): 597-609.
- Nguyen Q. A., Tucker M. P., Keller F. A., Eddy F. P. (2000). Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods. U: *Twenty-first Symposium on biotechnology for fuels and chemicals* Humana Press, Totowa, NJ., str. 561-576.
- Ouyang S., Qiao H., Xu Q., Zheng Z., Ouyang J. (2019). Development of two-step pretreatment of Chinese fir sawdust using dilute sulfuric acid followed by sodium chlorite for bioethanol production. *Cellulose*, **26**(15): 8513-8524.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource technology*, **74**(1): 17-24.
- Palonen H., Thomsen A. B., Tenkanen M., Schmidt A. S., Viikari L. (2004). Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. *Applied biochemistry and biotechnology*, **117**(1): 1-17.
- Pan X., Xie D., Gilkes N., Gregg D. J., Saddler J. N. (2005). Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **124-125**: 1069–1079.
- Pravilnik o područjima provenijencija svojti šumskog drveća od gospodarskog značaja (2018) *Narodne novine* **107** <https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_09_107_3185.html> Pristupljeno 17. kolovoza 2020.
- Prieur B., Meub M., Wittemann M., Klein R., Bellayer S., Fontaine G., Bourbigot S. (2017). Phosphorylation of lignin: characterization and investigation of the thermal decomposition. *RSC advances*, **7**(27): 16866-16877.
- Qin L., Li W. C., Liu L., Zhu J. Q., Li X., Li B. Z., Yuan Y. J. (2016). Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. *Biotechnology for biofuels*, **9**(1): 1-10.
- Rezić T., Šantek M. I., Andlar M., Pavlečić M., Šantek B. (2016). Comparison of different techniques for bioethanol production from lignocellulosic raw materials. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **11**(1/2): 6-17.
- Ross P., Mayer R., Benziman M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **55**(1): 35-58.
- Senila L., Costiu, S., Becze A., Kovacs D., Kovacs E., Scurtu D. A., Todor-Boer O., Senila M. (2020). Bioethanol production from *Abies Alba* wood using adaptive neural fuzzy interference system mathematical modeling. *Cellulose chemistry and technology*, **54**(1-2): 53-64.
- Taherzadeh M. J., Karimi K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*, **9**(9): 1621-1651.

- Vignon M. R., Garcia-Jaldon C., Dupeyre D. (1995). Steam explosion of woody hemp chenevotte. *International journal of biological macromolecules*, **17**(6): 395-404.
- Yat S. C., Berger A., Shonnard D. R. (2008). Kinetic characterization for dilute sulfuric acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. *Bioresource technology*, **99**(9), 3855-3863.
- Zabed H. M., Akter S., Yun J., Zhang G., Awad F. N., Qi X., Sahu J. N. (2019). Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **105**: 105-128.
- Žeger Tomislav (2012). Određivanje pentozana različitih vrsta drva UV- spektrofotometrijskom analizom. *Diplomski rad*, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet.

Izjava o izvornosti

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

Klara Pawic

ime i prezime studenta