

# Potencijal korištenja bukovine biotehnološkim metodama

---

Žugec, Mihaela

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

*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:159:966547>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Mihaela Žugec**

7552/BT

**POTENCIJAL KORIŠTENJA BUKOVINE  
BIOTEHNOLOŠKIM METODAMA**

**ZAVRŠNI RAD**

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

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

**Zagreb, 2021.**

*Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada 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 mentorici prof. dr. sc. Vlatki Petravić Tominac na pruženoj prilici za izradu ovog završnog rada, stručnom vođenju te savjetima i pomoći prilikom pisanja.*

*Posebno hvala mojoj obitelji, prijateljima i kolegama na podršci tijekom cijelog dosadašnjeg studiranja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

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

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

**Potencijal korištenja bukovine biotehnološkim metodama**

***Mihaela Žugec, 0058212439***

**Sažetak:** Lignocelulozne sirovine dostupne u Hrvatskoj čini uglavnom otpad iz poljoprivrede, šumarstva, prehrambene i drvne industrije. Tri su osnovna strukturna polimera lignoceluloze: celuloza, hemiceluloza i lignin. Da bi se lignoceluloza mogla koristiti u biotehnološkim procesima, potrebno je provesti odgovarajuću predobradu sirovine kojom se razara njezina čvrsta struktura. Postoje različite metode predobrade, a dijele se na fizikalne, kemijske, fizikalno-kemijske i biološke. U ovom radu dan je pregled prednosti i nedostataka pojedinih metoda predobrade lignoceluloznih sirovina. Također je prikazan biotehnološki potencijal tvrdog drva s naglaskom na bukovinu.

**Ključne riječi:** bukva, kiselinska predobrada, lignoceluloza, tvrdo drvo

**Rad sadrži:** 40 stranica, 15 slika, 7 tablica, 70 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**  
**Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23,**  
**10 000 Zagreb**

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

**Datum obrane:** 16. rujan 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology**

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

**Potential of using beech wood using biotechnological methods**

***Mihaela Žugec, 0058212439***

**Abstract:** Lignocellulosic raw materials available in Croatia are mainly waste from agriculture, forestry, food and wood industry. Lignocellulose mainly consists of three structural polymers: cellulose, hemicellulose and lignin. In order to use lignocellulose in biotechnological processes, it is necessary to perform an appropriate pretreatment of the raw material which disrupts its solid structure. There are various pretreatment methods which are classified into physical, chemical, physicochemical and biological treatment. This thesis points out some advantages and disadvantages of the most common methods for lignocellulosic biomass pretreatment. It also gives insight into the biotechnological potential of hardwood with emphasis on beech wood.

**Keywords:** acid pretreatment, beech, hardwood, lignocellulose

**Thesis contain:** 40 pages, 15 figures, 7 tables, 70 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. Vlatka Petravić Tominac

**Defence date:** September 16, 2021

# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. LIGNOCELULOZNE SIROVINE I KEMIJSKI SASTAV LIGNOCELULOZE .....</b>	<b>2</b>
<i>2.1.1. Celuloza .....</i>	<i>3</i>
<i>2.1.2. Hemiceluloza .....</i>	<i>3</i>
<i>2.1.3. Lignin .....</i>	<i>4</i>
<i>2.1.4. Ostali sastojci lignoceluloze .....</i>	<i>5</i>
<i>2.1.5. Povezivanje lignoceluloznih komponenti .....</i>	<i>5</i>
<b>2.2. METODE PREDOBRADE LIGNOCELULOZE .....</b>	<b>6</b>
<i>2.2.1. Fizikalne metode predobrade.....</i>	<i>7</i>
<i>2.2.2. Kemijske metode predobrade .....</i>	<i>8</i>
<i>2.2.3. Biološke metode predobrade .....</i>	<i>10</i>
<i>2.2.3. Fizikalno-kemijske metode .....</i>	<i>11</i>
<i>2.2.4. Kombinirane metode predobrade.....</i>	<i>12</i>
<b>2.3. POTENCIJAL BUKOVINE KAO LIGNOCELULOZNE SIROVINE .....</b>	<b>17</b>
<i>2.3.1. Sastav bukovine .....</i>	<i>18</i>
<b>2.4. PRIMJERI KISELINSKE PREDOBRADE BUKOVINE .....</b>	<b>19</b>
<b>2.5. ODABRANI BIOTEHNOLOŠKI PROIZVODI DOBIVENI IZ BUKOVINE .....</b>	<b>29</b>
<i>2.5.1. Biogoriva.....</i>	<i>29</i>
2.5.1.1. Bioetanol.....	29
2.5.1.2. Biobutanol.....	30
<i>2.5.2. Polihidroksialkanoati .....</i>	<i>31</i>
<i>2.5.3. Ksilitol.....</i>	<i>32</i>
<i>2.5.4. Jantarna kiselina.....</i>	<i>33</i>
<b>3. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>34</b>
<b>4. LITERATURA.....</b>	<b>35</b>

# 1. UVOD

U prošlosti je malo pažnje bilo posvećeno dobivanju biotehnoloških proizvoda iz drvnih sirovina te se drvo u značajnoj mjeri koristilo samo za proizvodnju papira. Takav stav se mijenja u novije vrijeme te dolazi do promjena potaknutih povećanjem ekološke svijesti i novim znanstvenim saznanjima, ali i zakonskim ograničenjima konvencionalnih procesa (Mai, 2004). Lignocelulozne sirovine, kao najrasprostranjenija skupina sirovina na Zemlji, perspektivna su alternativa petrokemijskim fosilnim resursima za proizvodnju biogoriva i drugih bioproizvoda. Nejestive su i stoga ne predstavljaju konkurenciju proizvodnji hrane (Simon, 2013). Trenutno lignocelulozna biomasa i otpad čine oko 10% svjetske opskrbe energijom (Kan, 2016).

U lignoceluloznu biomasu ubrajamo različite poljoprivredne ostatke te šumski i drveni otpad (Sun i Cheng, 2002). Glavni sastojci lignoceluloze su celuloza (35 – 55%), hemiceluloza (20 – 40%) i lignin (10 – 25%). Ostatak čine manje zastupljene komponente kao što su ekstraktivne tvari, voda, proteini, lipidi i sl. Celuloza i hemiceluloza sastavljene su od fermentabilnih šećera. Lignin štiti celulozu od bilo kakve razgradnje izazvane enzimima ili kemijskim katalizatorima stoga je nužno provesti predobradu lignocelulozne sirovine. Razvijene su brojne metode predobrade, a svima je cilj razoriti strukturu ili ukloniti lignin kako bi celuloza postala dostupnija razgradnji (Schwiderski, 2014). Metode predobrade lignoceluloznih sirovina dijele se na fizikalne, kemijske, biološke te fizikalno-kemijske. Predobrada razrijeđenom kiselinom jedna je od kemijskih metoda (Zhang i sur., 2020). Zadaća kiselinske predobrade je učiniti hemicelulozu topljivom i na taj način povećati dostupnost celuloze enzimima za daljnju obradu.

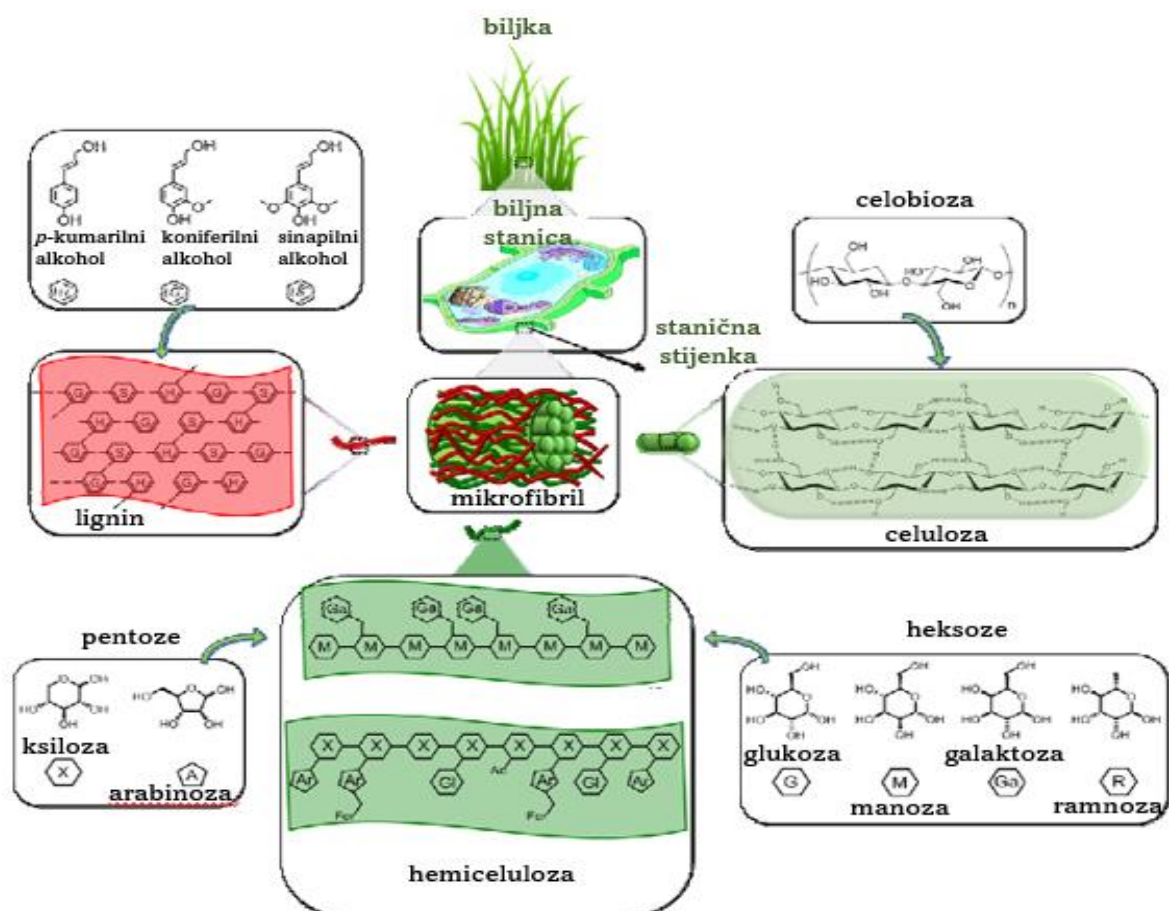
Cilj ovog rada je prikazati neke metode predobrade lignocelulozne biomase, njihove prednosti i nedostatke, te trenutna dostignuća u predobradi drva bukve ili drugih vrsta tvrdog drveta razrijeđenom kiselinom. Uz to je prikazano i nekoliko primjera primjene nekih metoda predobrade za dobivanje potencijalno važnih biotehnoloških proizvoda iz bukve, odnosno tvrdog drva.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Lignocelulozne sirovine i kemijski sastav lignoceluloze

Lignoceluloza je najraširenija obnovljiva sirovina na Zemlji zahvaljujući tome što nastaje procesom fotosinteze iz vode i atmosferskog ugljikovog dioksida uz pomoć Sunčeve svjetlosti. Izvori lignoceluloze su različiti poljoprivredni ostaci (npr. trava, slama, kukuruzni oklasci i kukuruzovina, ostaci povrća) te šumski otpad i otpad drvne industrije (npr. lišće, kora, piljevina) (Sun i Cheng, 2002). Vrlo je važna za proizvodnju energije jer se iz nje mogu dobiti različiti oblici goriva, kao što su briketi, bioetanol, bioplina i sl. (Yousuf i sur., 2020). Najviše lignoceluloze ipak razgrade različiti mikroorganizmi u prirodi te se na kraju prevodi u ugljikov dioksid i vodu što je čini važnim dijelom ciklusa kruženja ugljika (Chen, 2014).



**Slika 1.** Struktura i glavne komponente lignoceluloze (Isikgor i Becer, 2015).

Lignoceluloza ima kompleksnu građu (Slika 1) u kojoj je celuloza umotana u gustu strukturu hemiceluloze i lignina. Uz ova tri strukturna polimera koji su osnovni sastojci lignoceluloze, manji udio čine pepeo i ekstraktivni spojevi. Udio pojedinih sastojaka varira ovisno o biljnoj vrsti i dijelu biljke pa tako u tvrdom drvu prevladava celuloza, dok je u lišću više hemiceluloze. Omjeri različitih komponenata u istoj vrsti variraju s obzirom na starost biljke, stadij rasta i druge okolišne uvjete (Bajpai, 2016).

### **2.1.1. Celuloza**

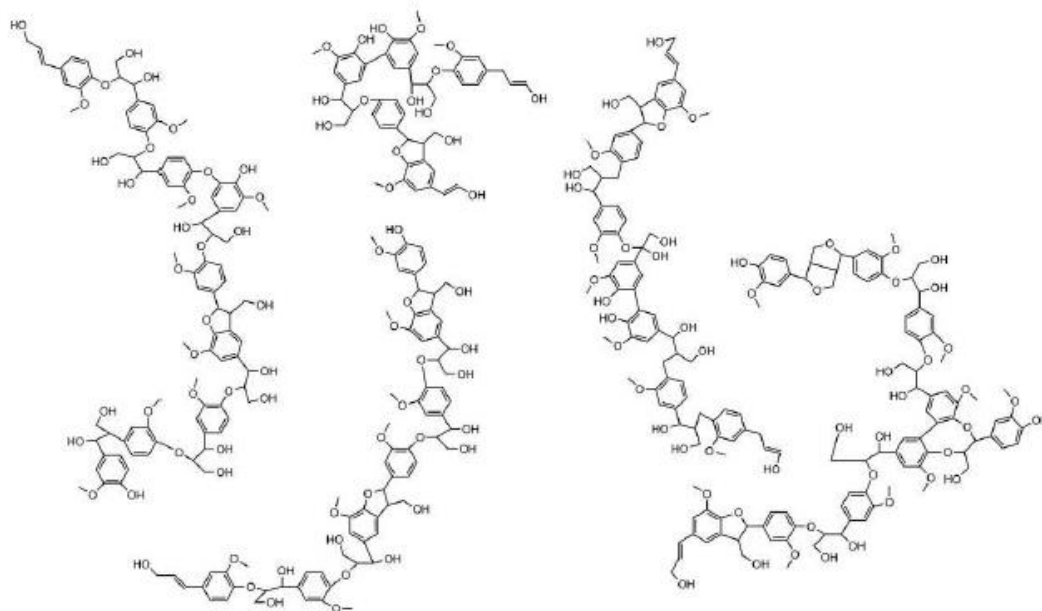
Celuloza je ugljikohidratni homogeni polimer kemijske formule  $(C_6H_{10}O_5)_n$  (Chen, 2014). Sastoji se od molekula D-glukoze povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama u ravne lance. Glavni je strukturni element stanične stijenke biljaka te najzastupljeniji organski polimerni materijal na svijetu. Lanci celuloze međusobno se povezuju vodikovim vezama i van der Waalsovima interakcijama u mikrofibrile koji se udružuju tvoreći celulozna vlakna (Bajpai, 2016). Mikrofibrile okružuju hemiceluloza i lignin vezani kovalentnim vezama (Chen, 2014). Celuloza je u biomasi prisutna u kristaliničnom, pravilno uređenom, te manjim dijelom u amorfnom, neuređenom obliku. Temeljna građevna jedinica celuloze je celobioza, odnosno dimer dviju molekula glukoze. Molekula celuloze može se sastojati od nekoliko tisuća pa do preko 10 000 glukoznih jedinica (Bajpai, 2016), a njihov broj predstavlja stupanj polimerizacije (n u kemijskoj formuli). Celuloza nije topiva u vodi niti u razrijeđenim kiselinama i lužinama (Chen, 2014).

### **2.1.2. Hemiceluloza**

Hemiceluloza je razgranati heteropolimer, relativno niske molekulske mase, sastavljen od 500 do 3000 različitih šećernih jedinica. Među njima su najčešće pentoze (ksilozna i arabinoza), zatim heksoze (manoza, glukoza, galaktoza i ramnoza) te acetilirani šećeri. Hemiceluloza umrežena s celulozom i ligninom učvršćuje staničnu stijenku (Yousuf i sur., 2020). Okosnica hemiceluloze je homopolimer ili heteropolimer s kratkim ograncima od dva ili više monosaharida. Ogranci su na okosnicu vezani  $\beta$ -1,4 ili ponekad i  $\beta$ -1,3-glikozidnim vezama te se lako hidroliziraju (Bajpai, 2016). Sastav hemiceluloze ovisi o vrsti lignocelulozne sirovine. U tvrdom drvu i travama prevladava ksilan, dok u mekom drvu ima najviše glukomanana (Isikgor i Becer, 2015). Uz ksilozu, ksilan može sadržavati arabinozu, glukuronsku, octenu, *p*-kumarinsku ili ferulinsku kiselinu (Bajpai, 2016).

### 2.1.3. Lignin

Lignin je kompleksan razgranat aromatski polimer sastavljen od umreženih fenolnih monomera. Pretežno je amorfne strukture (Yousuf i sur., 2020). Prisutan je u staničnoj stijenci biljaka kojoj daje krutu nepropusnu zaštitu od mikrobnog napada i oksidacijskog stresa te strukturnu potporu. Povezuje ostale komponente lignoceluloze poput ljepila i čini ju netopljivom u vodi (Bajpai, 2016). Glavni elementi koji čine lignin su ugljik, vodik i kisik. Lignin koji se nalazi u staničnim stijenkama trava sadrži i dušik, dok ga lignin u drvu ne sadrži (Nimz, 1974; Adler, 1957). Monomeri od kojih je lignin sastavljen su *p*-kumarilni, koniferilni i sinapilni alkohol, a međusobno se nasumično povezuju eterskim ili ugljik-ugljik vezama. Razlikuju se u broju metoksi skupina: *p*-kumarilni alkohol ne sadrži metoksi skupinu, koniferilni ima jednu, a sinapilni alkohol ima dvije metoksi skupine (Wertz i sur., 2018). Unutar strukture lignina postoji mnogo polarnih grupa koje međusobno stvaraju jake intramolekulske i intermolekulske vodikove veze. One omogućuju stvaranje stabilnog kompleksa između lignina i ugljikohidratnog dijela i čine ovu cjelovitu strukturu netopljivom. Kemijsko struktura lignina prikazana je na Slici 2. Nakon razbijanja strukture lignina i skraćivanja lanaca, dio lignina zbog amorfности postaje topljiv, a ostatak zadržava istu strukturu kakvu ima u sirovini (Chen, 2014).



**Slika 2.** Model različitih oligomera lignina (Crestini i sur., 2011).

#### 2.1.4. Ostali sastojci lignoceluloze

Manje zastupljeni sastojci lignoceluloze su proteini, lipidi, voda, ekstraktivne tvari, pepeo i drugo (Bajpai, 2016; Chen, 2014). U biljnoj stanici nalaze se brojni anorganski elementi koji su joj neophodni, kao što su kalcij, magnezij, fosfor, željezo, bakar, cink, mangan, te oni nakon spaljivanja drva tvore pepeo. Udio pojedinih elemenata ovisi o vrsti biljke te podneblju u kojem raste, a udio pepela u drvu iznosi manje od 1% (Chen, 2014). Ekstraktivne tvari su komponente koje se mogu izdvojiti pomoću otapala i obično ih u drvu umjerenog klimatskog područja ima 5 – 10%. Iako je njihov udio gotovo zanemariv u usporedbi s glavnim sastojcima lignoceluloze (celuloza, hemiceluloza, lignin), ekstraktivne tvari su vrlo raznolike te kemijski karakteriziraju svaku vrstu. Tu se ubrajaju pektini, terpeni, voskovi, gliceridi, šećeri, kinoni, itd. Utječu na boju, miris i trajnost drva (Umezawa, 1997).

#### 2.1.5. Povezivanje lignoceluloznih komponenti

U strukturi lignoceluloze utvrđene su četiri glavne vrste veza koje su prisutne unutar pojedinih komponenata te međusobno povezuju te kemijske spojeve u kompleks. To su eterska, esterska, ugljik-ugljik i vodikova veza (Harmsen i sur., 2010), a sumirane su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Pregled veza unutar lignoceluloze (Faulon i sur., 1994).

<b>Veze unutar komponenata (intrapolimerske veze)</b>		<b>Veze između različitih komponenata (interpolimerske veze)</b>	
eterska veza	lignin, hemiceluloza	eterska veza	celuloza- lignin hemiceluloza-lignin
ugljik-ugljik veza	lignin		
vodikova veza	celuloza	vodikova veza	celuloza-lignin hemiceluloza-lignin celuloza-hemiceluloza
esterska veza	hemiceluloza	esterska veza	hemiceluloza-lignin

## 2.2. Metode predobrade lignoceluloze

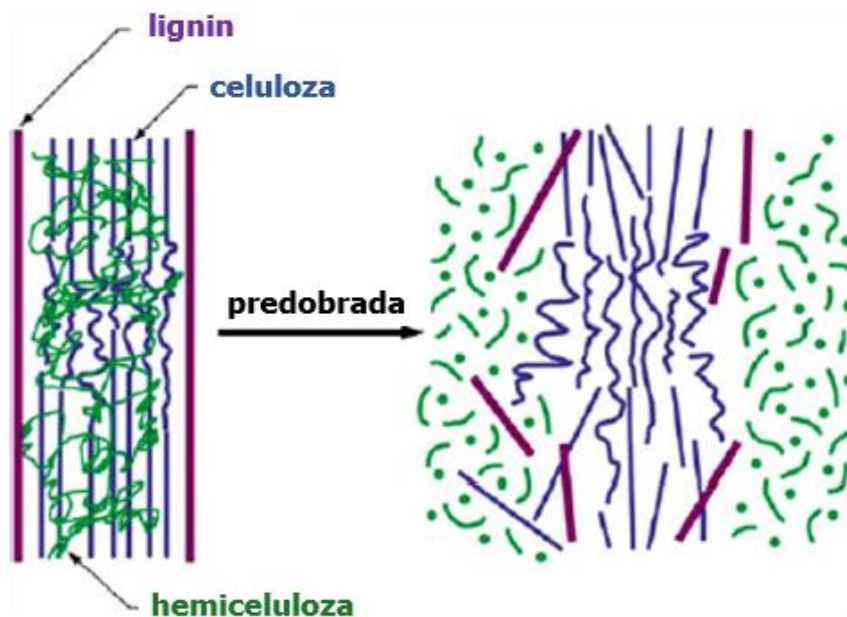
Lignocelulozna biomasa u svom izvornom obliku je izuzetno otporna prema enzimskoj razgradnji. Predobrada lignoceluloznih sirovina je nužna kako bi se smanjila kristaliničnost strukture da bi kiseline ili enzimi mogli doprijeti do celuloze i zatim ju hidrolizirati (Bajpai, 2016). Razvijene su mnoge metode predobrade kako bi se razbila stanična stijenka, uklonila hemiceluloza i lignin, povećala poroznost i kontaktna površina (Ma i sur., 2009). Moguće učinke različitih metoda predobrade prikazuju Tablica 2 te Slika 3. Ne postoji univerzalna predobrada za sve vrste lignocelulozne biomase, već raznolike metode od kojih svaka ima svoje prednosti i nedostatke. Pritom je cilj da metoda ima što veću učinkovitost, a da istodobno bude i jeftina. Metode predobrade se mogu svrstati u četiri skupine ovisno o funkciji i reagensu: fizikalne, kemijske, biološke te fizikalno-kemijske, a mogu se izdvojiti i kombinirane (hibridne) metode (Zhang i sur., 2020).

**Tablica 2.** Mehanizam predobrade lignocelulozne biomase (Bajpai, 2016).

Fizikalni učinci	Kemijski učinci
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ razaranje strukture</li><li>▪ povećanje dostupne površine</li><li>▪ poboljšanje ulaska enzima ili kemijskih reagensa u staničnu stijenku</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ depolimerizacija</li><li>▪ povećanje topljivosti</li><li>▪ razbijanje veza između makromolekula</li></ul>

Prilikom odabira metode predobrade potrebno je uzeti u obzir sljedeće čimbenike (Yang i Wyman, 2008; Alvira i sur., 2010):

- celuloza se nakon predobrade mora lako hidrolizirati uz prinos veći od 90%
- predobrada se mora provesti bez značajnog gubitka šećera uz minimalno nastajanje toksičnih spojeva (inhibitora)
- tekuća faza dobivena predobradom mora biti fermentabilna uz male troškove i velik prinos
- čvrsti ostatak nastao tijekom dobivanja hidrolizata ne smije ometati proces
- minimalni utrošak toplinske i električne energije
- upotreba reaktora prikladne veličine koji zahtijevaju umjerene troškove



**Slika 3.** Učinak predobrade na lignoceluloznu biomasu (Bajpai, 2016).

### 2.2.1. Fizikalne metode predobrade

Cilj fizikalnih metoda je smanjenjem veličine čestica materijala ili razbijanjem stanične stijenke povećati enzimima dostupnost površine lignocelulozne biomase. Najčešće se dijele u dvije skupine, a to su mehaničko usitnjavanje i predobrada zračenjem. U mehaničko usitnjavanje spadaju sjeckanje, rezanje, drobljenje i mljevenje. Usitnjavanje zračenjem može se provoditi pomoću  $\gamma$ -zraka, ultrazvuka, mikrovalova ili elektronskih snopova (Zhang i sur., 2020).

Potrebna količina energije kod fizikalnih metoda ovisi o uređaju kojim se obavlja predobrada, željenoj konačnoj veličini čestica te vrsti sirovine pa tako usitnjavanje tvrdog drveta zahtijeva više energije od usitnjavanja poljoprivrednih ostataka (Cadoche i López, 1989). Fizikalna predobrada najčešće se kombinira s drugim metodama (Zheng i sur., 2017).

Mehaničkim usitnjavanjem smanjuje se veličina čestica biomase i stupanj polimerizacije kako bi se povećala razgradivost. Mljevenje se može obaviti pomoću kugličnog mlina, mlina čekićara, mlina s valjcima, mlina s diskovima, koloidnog mlina ili vibracijskog mlina. Prilikom odabira metode mljevenja potrebno je uzeti u obzir vlažnost biomase (Zheng i sur., 2017). Mljevenje je prikladno prije ili nakon kemijske predobrade. Korištenjem nakon kemijske predobrade, značajno se smanjuje utrošak energije te ne nastaju inhibitori (Bajpai, 2016).

Fizikalne metode u kojima se primjenjuje zračenje omogućuju depolimerizaciju celuloze i lignina, povećavaju specifičnu površinu i njezinu dostupnost, narušavaju strukturu stanične stijenke i smanjuju stupanj polimerizacije (Zhang i sur., 2020). Predobrada mikrovalovima najčešće se koristi za zagrijavanje biomase prije drugog postupka, najčešće kemijske predobrade. Usitnjavanje elektronskim snopovima je djelotvorno kada se koristi prije predobrade octenom kiselinom, eksplozijom vodenom parom, ekstrakcijom vrućom vodom i sl. (Zhang i sur., 2020).

Piroliza je metoda razgradnje kojom se biomasa zagrijavanjem prevodi u hlapive komponente i krutinu bogatu ugljikom, tj. ugljen. Dio hlapivih komponenata kondenzira se u tekuću frakciju katrana ili bio-ulja, a ostatak čine nekondenzirajući plinovi (Sharma i sur., 2015). Tijekom pirolize, biomasa se tretira temperaturama višim od 300°C te dolazi do brze razgradnje celuloze. Pri nižim temperaturama razgradnja je sporija i nastaje manje hlapivih spojeva (Bajpai, 2016). Veći udio celuloze i hemiceluloze u biomasi dovodi do većeg prinosa bio-ulja dok veći udio lignina uzrokuje stvaranje više ugljena. Lignocelulozna biomasa obično zahtijeva upotrebu neke druge metode predobrade prije same pirolize kako bi se povećala njezina učinkovitost (Kan i sur., 2016).

Ekstruzija je termo-mehanički proces koji se obično kombinira s kemijskom predobradom. Tijekom procesa dolazi do miješanja, zagrijavanja i smicanja što dovodi do fizikalnih i kemijskih promjena u biomasi (Mood i sur., 2013). Potrebni su dodaci, kao što je glicerol, koji mijenjaju svojstva protoka lignocelulozne biomase kako bi se izbjeglo začepljenje opreme, iako mogu uzrokovati i razgradnju materijala (Zhang i sur., 2020).

### **2.2.2. Kemijske metode predobrade**

Kemijske metode predobrade obuhvaćaju kiselinsku hidrolizu, alkalnu hidrolizu, predobradu organskim otapalima, ionskim kapljevinama, sulfitom te ozonolizu.

Hidroliza kiselinom koristi se kao predobrada za različite vrste biomase kao što su zeljaste biljke i poljoprivredni ostaci, meko i tvrdo drvo. U tu svrhu mogu se upotrijebiti koncentrirane ili razrijeđene kiseline (Bajpai, 2016). Hidroliza razrijeđenom kiselinom se može provesti na visokoj temperaturi kroz kratko vrijeme ili na niskoj temperaturi kroz dulje vrijeme zadržavanja (Zabed i sur., 2017). Glavna svrha je učiniti hemicelulozu topljivom kako bi se povećala dostupnost celuloze enzimima (Alvira i sur., 2010). Najčešće se koriste sumporna, klorovodična, fosforna i dušična kiselina, a najviše se istražuje sumporna kiselina jer je visokoučinkovita i jeftina (Mosier i sur., 2005a). Upotreba koncentrirane kiseline omogućuje

odvijanje procesa na nižoj temperaturi, ali zbog njezine toksičnosti i korozivnosti koja zahtijeva i skuplju opremu, preferira se korištenje razrijeđene kiseline (Mood i sur., 2013). Nakon ovog predtretmana, kiselinu je potrebno neutralizirati prije daljnje enzimske hidrolize ili procesa fermentacije. Osim toga, nastaju i neki nusproizvodi razgradnje šećera, kao što su furfural i hidroksimetilfurfural koji inhibiraju metabolizam mikroorganizama (Saha i sur., 2005).

Predobrada organskim otapalima (organosolv) može se provoditi uz dodatak katalizatora (kiselina ili lužina) ili bez dodatka katalizatora, a najčešće se koriste metanol, etanol, aceton i etilen-glikol (Mood i sur., 2013). Kada se ne koristi dodatni katalizator, potrebna je velika koncentracija organskog otapala (minimalno 60%) i visoka temperatura procesa (160 – 220°C) (Chen i sur., 2015). Organska kiselina koja nastaje tim procesom, npr. octena kiselina, može služiti kao katalizator te dolazi do razgradnje lignina i hemiceluloze i otapanja fragmenata lignina. Međutim, najčešće se dodaju mineralne kiseline čime se omogućuje veća učinkovitost predobrade uz blaže uvjete (Seidl i Goulart, 2016).

Alkalna delignifikacija je vrlo učinkovit i jednostavan postupak predobrade lignoceluloze. Lužine koje se najčešće koriste su natrijev hidroksid, natrijev karbonat, kalcijev hidroksid i amonijak. Djeluju tako da razgrađuju strukturu lignina i veze između lignina i ugljikohidrata čime ugljikohidrati postaju dostupniji za enzimsku razgradnju (Pandey i sur., 2000). Osim toga, dovode do bubrenja biomase što povećava unutarnju površinu i poroznost materijala te smanjuje stupanj polimerizacije i kristaliničnost celuloze (Bajpai, 2016). Alkalna delignifikacija je učinkovitija za predobradu zeljastih biljaka, a manje učinkovita za drvenastu biomasu. Lužine se također mogu koristiti kao katalizatori u procesu predobrade pomoću organskih otapala u blagim uvjetima gdje efikasno uklanjaju lignin (Zhang i sur., 2020).

Ionske kapljevine su organske soli s talištem nižim od 100°C (Radojčić Redovniković, 2020). Nazivaju se zelenim otapalima jer njihovom upotrebom ne nastaju toksični spojevi i gotovo 100% otapala se može regenerirati. Razgradnja lignocelulozne biomase pomoću ionskih kapljevina odvija se 1 – 24 h pri atmosferskom tlaku i temperaturama 90 – 130°C. Celuloza može biti otopljena u ionskoj kapljevini koja sadrži anione, kao što su klorid, acetat ili aminokiseline, jer oni stvaraju jake vodikove veze s hidroksilnim skupinama iz šećera. S druge strane, otapanje lignina omogućeno je zahvaljujući van der Waalsovima interakcijama lignina s kationima (Capolupo i Faraco, 2016).

Predobrada sulfitom smanjuje količinu energije potrebnu za usitnjavanje lignocelulozne biomase prije enzimske hidrolize tako što oslabljuje kemijsku strukturu biljnog materijala. Mogu se koristiti vodene otopine sulfita ili bisulfita širokog raspona temperatura i pH



vrijednosti. Posebno je pogodna za predobradu mekog i tvrdog drva. Lako se može kombinirati s drugim metodama, npr. predobradom razrijeđenom kiselinom, i na taj način povećati učinkovitost procesa (Bajpai, 2016).

Ozonoliza je metoda kojom dolazi do razgradnje lignina zbog cijepanja aromatskih prstena u njegovoj strukturi dok hemiceluloza i celuloza ostaju gotovo nerazgrađene (Harmsen i sur., 2010). Obično se provodi na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku (Alvira i sur., 2010). Uz razgradnju lignina, dolazi i do oslobađanja drugih topivih komponenata kao što su kiseline i aldehidi (Capolupo i Faraco, 2016).

### 2.2.3. Biološke metode predobrade

Biološke metode odnose se na upotrebu mikroorganizama ili enzima za predobradu različitih tipova lignocelulozne biomase koja prethodi enzimskoj hidrolizi polisaharida (Sun i sur., 2016). Uglavnom se koriste gljive smeđeg truljenja i gljive bijelog truljenja te pojedine bakterije. Ovi organizmi razgrađuju lignin, djelomično hidroliziraju hemicelulozu i smanjuju stupanj polimerizacije celuloze (Zheng i sur., 2017). Najučinkovitije i najšire primjenjivane u procesu predobrade su gljive bijelog truljenja (Taherzadeh i Karimi, 2008). Neke bakterije, kao što su *Bacillus subtilis* i *Streptomyces lavendulae*, mogu razgraditi lignin pomoću lakaza (Capolupo i Faraco, 2016). Gljive bijelog i mekog truljenja posjeduju enzimske sustave koji se sastoje od ksilanaza, lignin peroksidaza, polifenol oksidaza, peroksidaza ovisnih o manganu i lakaza pa kataliziraju razgradnju lignina i hemiceluloze (Zheng i sur., 2017). Biološke metode predobrade također se kombiniraju s ostalim metodama, npr. kemijskim i fizikalno-kemijskim (Zhang i sur., 2020).



**Slika 4.** a) Gljiva bijelog truljenja, *Phanerochaete chrysosporium* (Anonimus 1, 2004);  
b) Kolonija bakterije *Bacillus subtilis* (Anonimus 2, 2020).

### 2.2.3. Fizikalno-kemijske metode

Hidrotermalna ili predobrada tekućom vrućom vodom je proces u kojem se kao medij za zagrijavanje koristi voda zagrijana na visoku temperaturu (130 – 240°C) pod visokim tlakom kako bi se voda zadržala u tekućem stanju (Zheng i sur., 2017). Pri visokoj temperaturi i tlaku, voda disocira na  $H_3O^+$  i  $OH^-$  ione koji mogu djelovati kao kiselinski ili bazni katalizatori (Putro i sur., 2016). Kidaju se veze između poluacetalna i oslobađaju kiseline što dovodi do razaranja eterskih veza u biomasi (Bajpai, 2016). Ovaj način predobrade može se koristiti kao alternativa tretmanu razrijeđenom mineralnom kiselinom ukoliko se radi o biljnoj biomasi koju tvore zeljaste biljke. Djelomično hidrolizira hemicelulozu te narušava strukture lignina i celuloze. Nastanak inhibitora može se ograničiti održavanjem pH vrijednosti između 4 i 7 (Mosier i sur., 2005b).

Tijekom eksplozije vodene pare, biomasa se kratko zagrijava zasićenom parom pod visokim tlakom. Nakon nekoliko sekundi ili minuta, tlak se naglo smanjuje zbog čega dolazi do eksplozivne dekompresije i hidrolize biomase. Smanjuje se veličina vlakana u biomasi, lignin i hemiceluloza se razgrađuju, a time se povećava podložnost celuloze hidrolizi (Zheng i sur., 2014). Parametri koji su važni za učinkovitost procesa su vrijeme zadržavanja, temperatura (160 – 260°C), tlak (0.69 – 4.83 MPa), veličina čestica biomase i udio vlage. Kao katalizatori hidrolize celuloze tijekom predobrade eksplozijom vodene pare mogu poslužiti sama voda, koja na visokoj temperaturi djeluje kao kiselina, te octena kiselina, koja nastaje iz acetilnih grupa hemiceluloze kao nusproizvod (Zheng i sur., 2017). Ovaj postupak učinkovit je za zeljastu biomasu i tvrdo drvo, a nije zadovoljavajući za predobradu mekog drveta, osim uz upotrebu jakog katalizatora, kao što je sumporna kiselina, u žešćim uvjetima (Sun i Cheng, 2002).

Eksplozija vlakana amonijakom (AFEX) je metoda slična predobradi eksplozijom vodene pare. Tijekom procesa lignocelulozna biomasa izložena je tekućem amonijaku pri visokoj temperaturi i tlaku kroz određeno vrijeme, a zatim se tlak naglo smanji (Bajpai, 2016). Obično se provodi na umjerenj temperaturi (60 – 120°C) uz vrijeme zadržavanja 5 – 30 minuta. Ova metoda ne oslobađa izravno šećere iz biomase, već omogućuje enzimima pristup do polisaharidnih polimera hemiceluloze i celuloze (Sarkar i sur., 2012).

Superkritični fluid je fluid koji se nalazi pri temperaturi višoj od kritične temperature i komprimiran pri tlaku većem od njegovog kritičnog tlaka. Takvi fluidi imaju svojstvo difuzije kao plinovi te topljivost kao tekućine (Radojčić Redovniković, 2020). Superkritični  $CO_2$  difundira u međuprostore biomase i otapa se u vodi čime nastaje ugljična kiselina koja hidrolizira hemicelulozu. Tijekom procesa,  $CO_2$  se uvodi u reaktor s biomasom pod visokim tlakom i

zagrijava se na određenu temperaturu na kojoj se zadržava nekoliko minuta, a zatim se tlak naglo spušta te dolazi do razbijanja strukture lignoceluloze (Zhang i sur., 2020). Metoda nije učinkovita za potpuno suhu biomasu, a prinos nakon hidrolize se povećava proporcionalno s povećanjem udjela vlage u biomasi (Bajpai, 2016).

Oksidativna predobrada uključuje djelovanje oksidansa na biomasu na način da izazivaju depolimerizaciju komponenata lignoceluloze, posebice lignina (Zhang i sur., 2020), pri čemu se lignin pretvara u kiseline. Delignifikacija se može provesti različitim oksidansima, a najčešće se koriste mokra oksidacija, vodikov peroksid i peroksi kiseline (Bajpai, 2016).

#### **2.2.4. Kombinirane metode predobrade**

Svaka metoda ima svoje prednosti i nedostatke (Tablica 3), a različite vrste biomase imaju različitu strukturu zbog čega ne postoji univerzalna metoda učinkovita za sve. Kako bi se postigla visoka učinkovitost predobrade, najčešće se kombinira nekoliko metoda (Zhang i sur., 2020). Cilj je skratiti vrijeme predobrade, smanjiti nastajanje inhibitora, poboljšati učinkovitost procesa te smanjiti potrošnju energije (Zheng i sur., 2017).

Jedna od mogućih kombiniranih metoda je predtretman kiselinom i lužinom uzastopno. Kiselina može hidrolizirati veliki dio hemiceluloze, a predobrada lužinom učinkovito uklanja lignin te se stoga njihovom kombinacijom može postići razdvajanje komponenata lignocelulozne biomase uz veliku izloženost celuloze (Zhang i sur., 2020). Također, predobrada razrijeđenom kiselinom može se provesti kao prvi korak, nakon kojeg u drugom koraku slijedi enzimaska hidroliza čvrstog zaostalog dijela. To je obećavajuća metoda za postizanje velikih prinosa šećera iz drvene biomase. Kiselinskom hidrolizom dolazi do otapanja ksilana, povećanja dostupne površine i volumena pora u drvu te se na taj način poboljšava uspješnost enzimske hidrolize (Lee i Yu, 2020).

**Tablica 3.** Prednosti i nedostaci metoda predobrade lignoceluloznih sirovina (Zhang i sur., 2020; Bajpai, 2016; Mood i sur., 2013; Sarkar i sur., 2012; Travaini i sur., 2016; Capolupo i Faraco, 2016; Zheng i sur., 2017)

Metoda predobrade	Prednosti metode	Nedostaci metode
<b>Mehanička predobrada</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ smanjuje kristaliničnost celuloze</li> <li>▪ ne nastaju inhibitori ili ih nastaje malo</li> <li>▪ nema otpada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ visok utrošak energije</li> <li>▪ razgradivost celuloze nakon predobrade nije dovoljno zadovoljavajuća</li> <li>▪ potrebno kombinirati s drugim metodama</li> </ul>
<b>Predobrada zračenjem</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ jednostavna</li> <li>▪ ne nastaju inhibitori ili ih nastaje malo</li> <li>▪ nastaje malo otpada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ zahtijeva puno energije</li> <li>▪ spora</li> <li>▪ skupa</li> <li>▪ potrebno kombinirati s drugim metodama</li> </ul>
<b>Piroliza</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ brza razgradnja celuloze</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ visoka temperatura</li> <li>▪ visok utrošak energije</li> <li>▪ niska učinkovitost</li> <li>▪ nastajanje ugljena i pepela</li> </ul>
<b>Ekstruzija</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ kratko vrijeme zadržavanja</li> <li>▪ može se provoditi kao kontinuirani proces</li> <li>▪ ne nastaju inhibitori ili ih nastaje malo</li> <li>▪ nema otpadne vode</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ zahtijeva kombiniranje s drugim metodama (kiselinska, alkalna ili hidrotermalna)</li> </ul>
<b>Predobrada kiselinom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ velika brzina reakcije</li> <li>▪ značajno poboljšanje hidrolize celuloze i hemiceluloze</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ potrebno je prethodno usitnjavanje čestica biomase</li> <li>▪ pojava korozije – potrebna skupa oprema</li> <li>▪ nastajanje inhibitora</li> <li>▪ hidrolizat je potrebno neutralizirati prije daljnjeg korištenja</li> <li>▪ skuplja od većine fizikalno-kemijskih metoda</li> </ul>

<b>Predobrada organskim otapalima (organosolv)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ne zahtijeva značajno smanjivanje veličine čestica biomase prije predobrade</li> <li>▪ vrlo učinkovita za biomasu s visokim udjelom lignina</li> <li>▪ izdvaja se lignin visoke čistoće prikladan za upotrebu kao zamjena za polimerne materijale u proizvodnji bioplastike</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ skupa</li> <li>▪ visoki troškovi otapala i dodatnih katalizatora</li> <li>▪ potrebna stroga kontrola procesa zbog hlapivosti otapala</li> <li>▪ organske kiseline mogu dovesti do aciliranja celuloze – smanjuje se razgradivost celuloze pomoću celulaza</li> </ul>
<b>Alkalna predobrada</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ provodi se pri nižoj temperaturi i tlaku manja razgradnja šećera</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ relativno skupe kemikalije</li> <li>▪ dulje trajanje predobrade</li> <li>▪ mogu nastati soli koje se ne mogu regenerirati</li> <li>▪ manja učinkovitost što je veći udio lignina u biomasi</li> </ul>
<b>Predobrada ionskim kapljevina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ odvija se pri blagim uvjetima</li> <li>▪ velika brzina reakcije</li> <li>▪ mali utrošak energije</li> <li>▪ ionske kapljevine se lako recikliraju</li> <li>▪ minimalan utjecaj na okoliš</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ zahtijeva veliku količinu ionskih kapljevina koje su skupe</li> <li>▪ kapljevine postaju viskozne tijekom procesa što otežava rukovanje</li> <li>▪ uzrokuju inaktivaciju celulaza</li> </ul>
<b>Predobrada sulfitima</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ smanjuje utrošak energije na procese usitnjavanja biomase</li> <li>▪ visok prinos šećera</li> <li>▪ maksimalno uklanjanje lignina i hemiceluloze</li> <li>▪ nastaje manje inhibitora</li> <li>▪ mali troškovi kemikalija</li> <li>▪ pogodna za razne vrste lignocelulozne biomase</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ gubitak šećera u žestokim uvjetima</li> <li>▪ zahtijeva veliki volumen vode za ispiranje biomase nakon predobrade</li> <li>▪ visoki troškovi reciklacije reagensa</li> </ul>

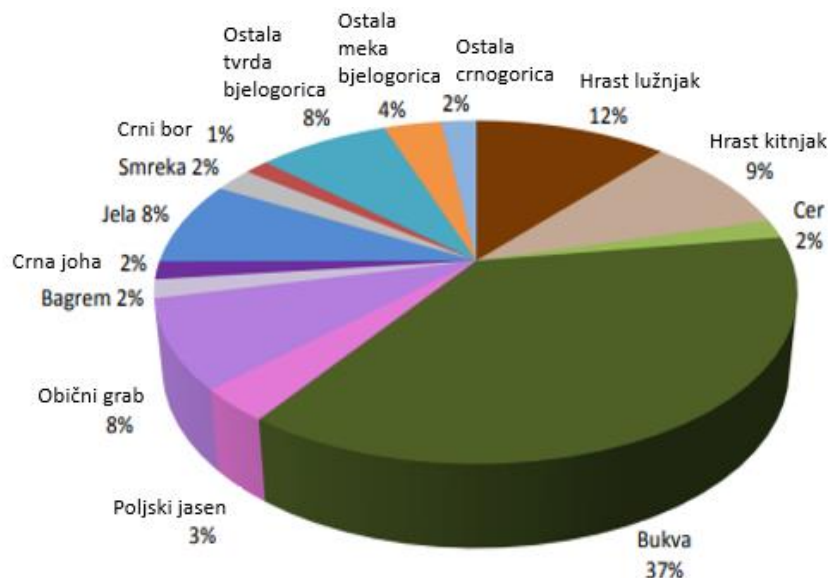
<b>Ozonoliza</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ razgrađuje lignin, a ne mijenja celulozu i hemicelulozu</li> <li>▪ ne nastaju inhibitori</li> <li>▪ provodi se na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ potrebna velika količina ozona</li> <li>▪ potencijalno opasna zbog velike reaktivnosti, zapaljivosti i korozivnosti ozona</li> <li>▪ zahtijeva puno energije</li> <li>▪ skupa</li> </ul>
<b>Biološka predobrada</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ mali zahtjevi za energijom</li> <li>▪ nisu potrebne kemikalije ili ih je potrebno malo</li> <li>▪ blagi uvjeti procesa</li> <li>▪ nema zagađenja okoliša</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ niska učinkovitost</li> <li>▪ dugo trajanje</li> <li>▪ dio fermentabilnih šećera se utroši kao izvor ugljika</li> </ul>
<b>Hidrotermalna predobrada</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ mali utrošak otapala (voda)</li> <li>▪ nije potrebno prethodno smanjivanje veličine čestica biomase</li> <li>▪ minimalno nastajanje inhibitora</li> <li>▪ niski kapitalni troškovi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ visok utrošak energije</li> <li>▪ niska koncentracija šećera iz hemiceluloze u hidrolizatu</li> <li>▪ velika količina otpadne vode</li> </ul>
<b>Eksplozija vodenom parom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ jeftina</li> <li>▪ mali utrošak energije</li> <li>▪ prikladna za velike čestice biomase</li> <li>▪ nisu potrebne dodatne kemikalije</li> <li>▪ visok prinos šećera</li> <li>▪ mali utjecaj na okoliš</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ nastaju inhibitori (furfural, hidrosimetilfurfural, fenoli)</li> <li>▪ velik utrošak vode za ispiranje biomase radi uklanjanja inhibitora što dovodi i do gubitka šećera</li> <li>▪ nepotpuna razgradnja lignina</li> </ul>
<b>Eksplozija vlakana amonijakom (AFEX)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ jednostavna</li> <li>▪ brza</li> <li>▪ ne nastaju inhibitori</li> <li>▪ nije nužno smanjivanje čestica biomase prije predobrade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ amonijak je skup</li> <li>▪ nije učinkovita za biomasu s velikim udjelom lignina</li> </ul>

<b>Eksplozija CO<sub>2</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ prikladna za velike čestice biomase</li> <li>▪ ne nastaju inhibitori</li> <li>▪ odvija se pri niskim temperaturama</li> <li>▪ mali utrošak energije</li> <li>▪ ekonomski isplativa</li> <li>▪ mali utjecaj na okoliš</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ne mijenja lignin ni hemicelulozu</li> <li>▪ potreban visoki tlak</li> </ul>
<b>Oksidacija</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ odvija se pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ nastaje topljivi lignin koji djeluje kao inhibitor</li> <li>▪ gubitak šećera</li> <li>▪ visoki troškovi reagensa</li> </ul>
<b>Predobrada kiselinom i lužinom uzastopno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ visok prinos šećera</li> <li>▪ poboljšana razgradivost celuloze uz manje potrebnih enzima</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ kompleksna</li> <li>▪ relativno visoki troškovi</li> <li>▪ javljaju se isti problemi kao i kod samostalne upotrebe kiselina tj. lužina</li> </ul>

### 2.3. Potencijal bukvine kao lignocelulozne sirovine

Drvo je obnovljivi prirodni organski materijal koji se često koristi u inženjerstvu i konstrukcijskim primjenama, unatoč nekim nepoželjnim svojstvima, kao što su biorazgradivost, zapaljivost i dimenzijska nestabilnost (skupljanje i širenje ovisno o primitku vlage) (Tomak i sur., 2010). Potencijalan izvor lignoceluloznih sirovina za biotehnološke procese u Republici Hrvatskoj je poljoprivredni i šumarsko-drveni otpad. To je otpad koji nastaje od ostataka iz poljoprivrede, šumarstva, prehrambene i drvne industrije, a procijenjeno je da ga proizvedemo 7.1 milijuna tona godišnje. Šumarski otpad nastaje eksploatacijom i uređivanjem šuma te se odnosi na lisnu masu stabala i granjevinu promjera manjeg od 7 cm. Drveni otpad nastaje u drvnoprerađivačkoj industriji u proizvodnji panela i namještaja, papira i kartona. Manji dio šumarsko-drvnog otpada koristi se u proizvodnji energije za potrebe drvnoprerađivačke industrije, dok veći dio trune u šumama ili na odlagalištima (Strategija gospodarenja otpadom Republike Hrvatske, NN 130/2005).

Obična bukva (*Fagus sylvatica* L.) bjelogorična je vrsta drva iz porodice *Fagaceae* (Bjedov i sur., 2016). Najrasprostranjenija je vrsta drveća u Hrvatskoj te je najzastupljenija vrsta u ukupnoj drvnj zalihi u kojoj sudjeluje sa 37% (Slika 5). Bukva uspješno raste u svim vegetacijskim pojasevima kontinentalne Hrvatske na raznolikim staništima. Uspijeva na neutralnim, lužnatim i jako kiselim tlima (Perić i sur., 2006). Klasificira se kao tvrdo drvo srednje gustoće te je težak, tvrd, čvrst i elastičan materijal. Značajno se skuplja, stoga zahtijeva pažljivo sušenje. Najčešće se koristi za namještaj, parkete, furnir, drveno posuđe, igračke i slično (Bektas i sur., 2002).

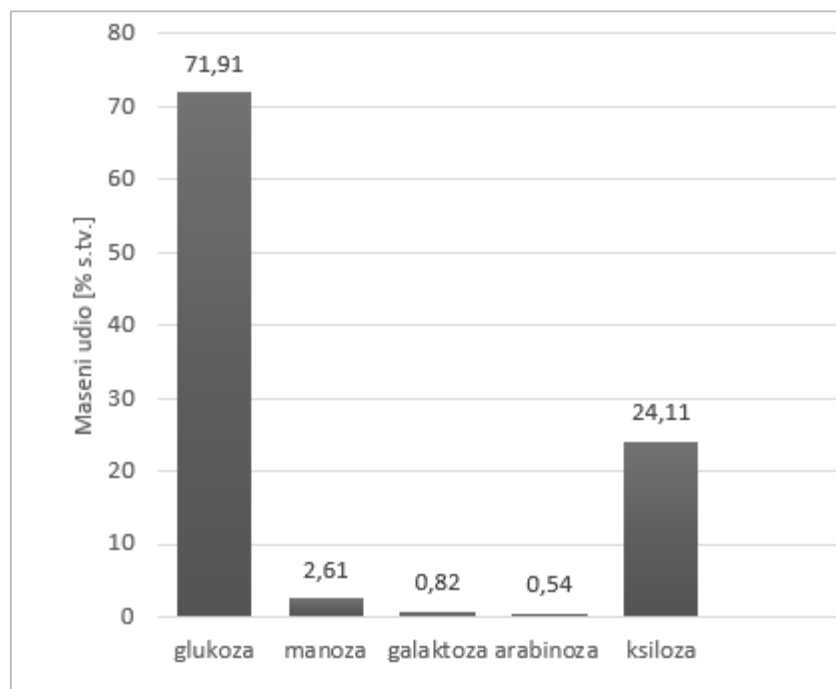


**Slika 5.** Udio pojedinih vrsta drveća u ukupnoj drvnj zalihi Republike Hrvatske (Šumskogospodarska osnova, 2017).



### 2.3.1. Sastav bukovine

Drvo bukve s kojeg je uklonjena kora sastoji se od 23.0% lignina, 3.07% ekstraktivnih spojeva i 73.93% polisaharida, od čega 55.7% čine heksoze i 18.23% pentoze (da Silva Perez, 2010). Prema Vek i sur. (2016), 33.7 – 46.4% bukve čini celuloza, a 11.8 – 25.5% čini hemiceluloza. Anorganske komponente, odnosno pepeo iznose 0.3 – 1.2%. Iz grafičkog prikaza sastava polisaharida (Slika 6), vidljivo je da ima najviše glukoze što je i očekivano s obzirom na visok udio celuloze. Od monosaharida koji čine hemicelulozu najzastupljenija je ksiloza, budući da okosnicu hemiceluloze u tvrdom drvu čini 1,4- $\beta$ -D-ksilopiranoza s ograncima 4-o-metil-D-glukuronske kiseline (Chen, 2014). Najveći udio lignina u tvrdom drvetu, pa tako i u bukvi, čine koniferilni i sinapilni alkohol dok se *p*-kumarilni alkohol nalazi u tragovima (Wertz i sur., 2018).



**Slika 6.** Udio pojedinih šećera u polisaharidima bukve (prema da Silva Perez, 2010).

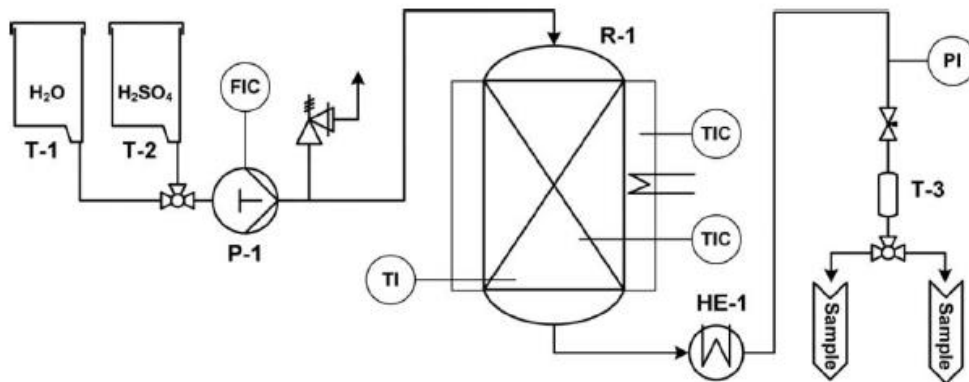
## 2.4. Primjeri kiselinske predobrade bukovine

Predobrada tvrdog drveta, odnosno bukovine, vrlo se učinkovito može provesti razrijeđenom kiselinom. Kiselinska predobrada ukratko je opisana u poglavlju 2.2.2. Tijekom tretmana razrijeđenom kiselinom dolazi do hidrolize hemiceluloze čime nastaju šećeri, glukoza, ksiloza, manoza i galaktoza te organske kiseline, mravlja i octena kiselina. Celuloza je zbog visokog stupnja polimerizacije, kristaliničnosti i prisustva vodikovih veza stabilnija od hemiceluloze te se zbog toga ne počinje hidrolizirati u blažim uvjetima, a njezinom hidrolizom nastaje glukoza. Ksiloza se može dalje u kiselim uvjetima i pri visokoj temperaturi dehidracijom prevesti u furfural, a glukoza u hidroksimetilfurfural (HMF). Kiselinskom predobradom uklanja se tek mali udio lignina kao topljivi lignin (Świątek i sur., 2020).

Batzias i Sidiras (2007) istražili su adsorpciju bojila na predobrađenu bukovu piljevinu čija je početna veličina čestica iznosila 0.2 – 0.8 mm, a udio vlage 9% w/w. Cilj je bio istražiti njezinu potencijalnu upotrebu kao jeftinog adsorbensa za uklanjanje bojila iz otpadnih voda. U tu svrhu provedena je blaga hidroliza piljevine primjenom 1.8 M sumporne kiseline uz omjer kiseline i sirovine 10:1. Hidroliza je provedena u šaržnom reaktoru pri temperaturi 100 °C te su istražena dva vremena zadržavanja (1 h i 4 h). Usporedba sastava piljevine prije i nakon predobrade prikazana je u Tablici 4. Iskorištenje hidrolize je za trajanje procesa 1 h iznosilo 80.3% te 69.3% za trajanje 4 h. Rezultati istraživanja pokazali su da blaga kiselinska hidroliza bukove piljevine znatno povećava njezinu adsorpcijsku sposobnost zahvaljujući otvaranju strukture lignoceluloze i povećanju specifične površine materijala do čega dolazi uklanjanjem hemiceluloze pri čemu su bolji rezultati postignuti trajanjem predobrade 4 h.

**Tablica 4.** Sastav bukove piljevine prije i nakon predobrade razrijeđenom kiselinom (Batzias i Sidiras, 2007).

komponenta	sastav (% w/w suhe tvari)		
	sirovina	piljevina bukve nakon predobrade	
		1 h	4 h
celuloza	41.5	49.1	46.2
hemiceluloza	27.3	15.4	0.8
lignin netopljiv u kiselini	25.7	32.0	37.1
pepeo	0.05	0.06	0.07
ekstraktivne i druge komponente	5.5	3.4	15.9



**Slika 7.** Procesni dijagram kiseline hidrolize biomase (Świątek i sur., 2020).

Świątek i sur. (2020) provedli su kiselinu hidrolizu tri različite vrste lignocelulozne biomase, među kojima je bila i bukva. Cilj eksperimenta bio je ispitati kako različita temperatura i trajanje hidrolize djeluju na nastajanje topljivih organskih komponenata kod različitih vrsta sirovine. Korišten je čips bukve dimenzija 30 x 15 x 1-2 mm. Predobrada je provedena polukontinuiranim postupkom sa sumpornom kiselinom ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) koncentracije  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  pri tlaku od 25 bara i pri temperaturama 180, 200 i 220 °C. Polukontinuirani način vođenja procesa omogućuje brzo uklanjanje komponenata topljivih u vodi iz vrućeg reaktora kako ne bi došlo do sekundarnih reakcija. Shemu korištenog postrojenja za kiselinu hidrolizu prikazuje Slika 7. Kiselina (T-2) se kontinuirano unosi pumpom (P-1) uz protok  $15 \text{ mL min}^{-1}$ , a u reaktor (R-1) je stavljeno 15 g čipsa bukve. Prosječno vrijeme zadržavanja tekuće faze u reaktoru je bilo 7 minuta, a tijekom zagrijavanja reaktora kroz njega je umjesto kiseline upumpavana deionizirana voda (T-1). Reaktor je bio opremljen s dva termopara za mjerenje temperature. Po izlasku iz reaktora, tekuća faza je hlađena u izmjenjivaču topline (HE-1) te su u intervalima od 5 – 8 min uzimani uzorci. Nakon procesa napravljena je analiza tekuće (pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, HPLC) i krute faze (termogravimetrijski i IR-spekrometrijom).

Iz rezultata (Tablica 5) je vidljivo da produljenjem vremena trajanja hidrolize, kao i povećanjem temperature, dolazi do povećanja prinosa glukoze. Glukoza koja se oslobađa u blažim uvjetima najvjerojatnije potječe iz hemiceluloze dok pri žestćim uvjetima dolazi do hidrolize celuloze. Prinos ksiloze je na svim temperaturama tijekom produljenja vremena konstantan jer se većina ksiloze oslobodi na samom početku procesa. Manozna potječe iz hemiceluloze te bi se većina trebala osloboditi u isto vrijeme kada i ksiloza. Međutim, prinos manoze naglo se poveća u uvjetima u kojima je prisutno puno glukoze što se tumači kao

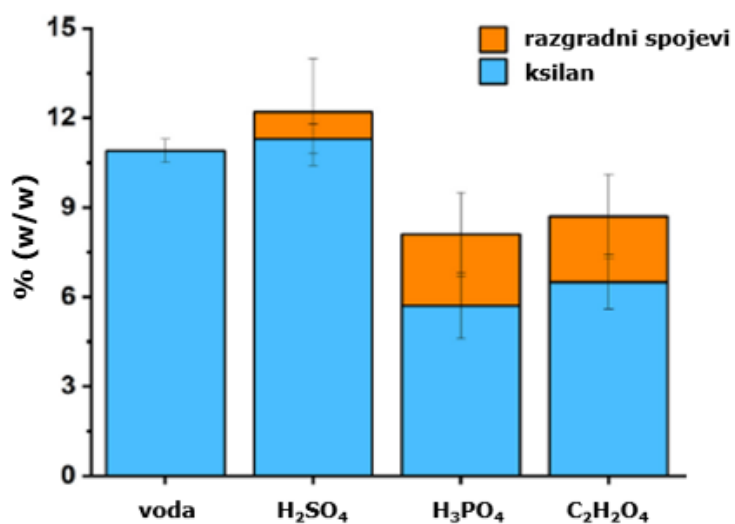
mogućnost da je pri visokoj koncentraciji glukoze došlo do epimerizacije glukoze u manozu. Viša temperatura i dulje trajanje hidrolize doveli su do povećanja prinosa inhibitora, HMF-a, furfurala te mravlje, octene i levulinske kiseline. HMF nastaje iz heksoza, a mravlja i levulinska kiselina nastaju rehidracijom HMF-a. Octena kiselina posljedica je hidrolize acetilnih grupa prisutnih u hemicelulozi tj. deacetiliranja acetiliranog ksilana. Stoga se visok prinos octene kiseline dobiven kiselinskom hidrolizom može objasniti visokim udjelom acetiliranog ksilana u bukovini. Na temelju rezultata može se zaključiti da i temperatura i vrijeme trajanja imaju velik utjecaj na uspješnost hidrolize razrijeđenom kiselinom. Povećanjem temperature i produženjem trajanja hidrolize ne dolazi samo do povećanja prinosa šećera, već i porasta koncentracije njihovih derivata koji djeluju inhibicijski, te je nužno optimizirati uvjete ovisno o cilju procesa.

**Tablica 5.** Prinosi glavnih komponenata dobivenih kiselinskom hidrolizom čipsa bukve (Świątek i sur., 2020).

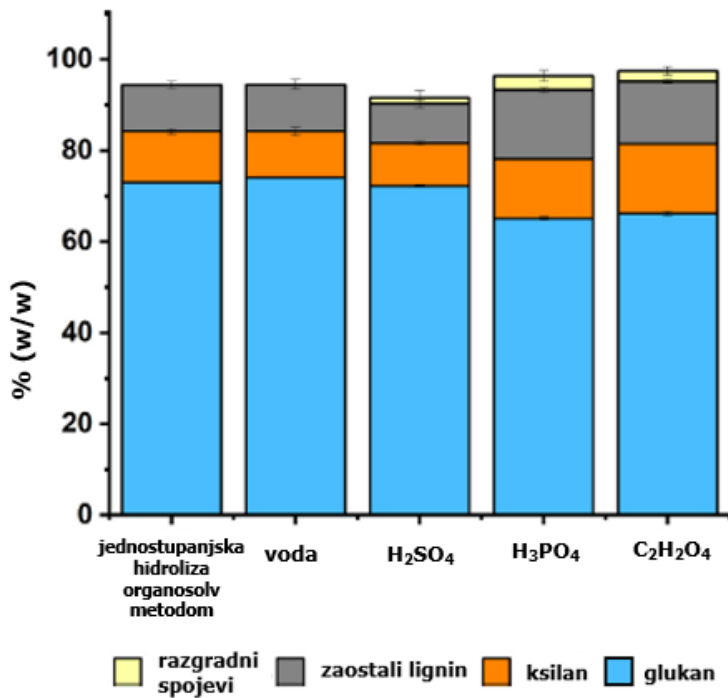
Prinos (mg g <sup>-1</sup> suhe tvari biomase)								
temperatura (°C)	180			200			220	
vrijeme (min)	20	40	60	20	40	60	20	40
glukoza	21.7	72.6	79.2	68.5	148.0	176.0	121.1	126.3
ksiloza	66.9	80.3	80.6	41.4	42.0	42.0	7.3	7.3
manozna	4.4	7.4	7.8	6.2	15.1	17.6	9.3	10.4
HMF	0.7	4.3	8.8	8.3	30.2	39.9	30.2	34.5
furfural	5.1	10.3	11.3	11.5	16.8	17.9	9.9	12.1
mravlja kiselina	1.0	1.5	1.9	2.5	10.6	15.5	12.2	21.4
octena kiselina	13.2	16.0	16.2	15.0	17.1	17.3	4.7	5.0
levulinska kiselina	1.0	1.2	1.2	1.8	20.1	31.2	26.2	44.8

Ibrahim i sur. (2020) istražili su učinak korištenja različitih kiselina tijekom predobrade na delignifikaciju bukovine organosolv metodom u dvostupanjskom procesu. Korišten je čips bukve veličine 2.5 – 3.5 mm. Sirovina je sadržavala 24.3% w/w lignina, 43.0% w/w glukana, 22.7% w/w ksilana, 5.6% w/w octene kiseline, 0.6% w/w pepela i 3.8% w/w ostalih komponenata. Provedeno je pet različitih eksperimenata. U prvom je provedena jednostupanjska hidroliza organskim otapalom, tj. etanolom, katalizirana dodatkom 100 mM sumporne kiseline, a u preostala četiri je provedena dvostupanjska hidroliza s kiselinskom predobradom u prvom stupnju te delignifikacijom pomoću etanola u drugom stupnju. U reaktor je stavljeno 100 g suhog čipsa bukve, a omjer tekućine i krutine je bio 4:1. Kiselinska predobrada odrađena je pri temperaturi 175 °C uz zadržavanje 1 h, a pritom su u tri eksperimentima korištene različite kiseline (20 mM sumporna kiselina, 20 mM fosforna kiselina i 200 mM oksalna kiselina) te je u jednom korištena voda. Nakon predobrade provedena je filtracija. Tekuća faza (hidrolizat i tekućina od ispiranja kolača) spremljena je za daljnje analize, a kruta faza je najprije obrađena organskim otapalom i zatim je podvrgnuta enzimskoj hidrolizi.

Tijekom kiselinske predobrade dolazi do otapanja hemiceluloze i amorfnje celuloze. Hidroliza hemiceluloze omogućuje uklanjanje ksilana prije tretmana organskim otapalom te njegov udio u hidrolizatu prikazuje Slika 8. Već prilikom predobrade vodom dolazi do otapanja ksilana jer hemiceluloza lako hidrolizira prilikom zagrijavanja. Dodatak sulfatne kiseline blago poboljšava, dok fosfatna i oksalna kiselina gotovo upola smanjuju prinos ksilana u hidrolizatu. Razlog tome mogao bi biti što fosfatna i oksalna kiselina preferiraju cijepanje glikozidnih veza ksilo-oligosaharida više od dehidracije i ostalih popratnih reakcija. Osim toga, kiseline dovode do stvaranja razgradnih spojeva, furfurala, HMF-a i octene kiseline, koji ne nastaju upotrebom vode. Nakon drugog stupnja hidrolize, tj. delignifikacije organosolv metodom, napravljena je analiza čvrste faze čiji rezultati su grafički prikazani na Slici 9. Čvrsta faza uglavnom je sastavljena od glukana iz celuloze i ostataka ksilana koji nije uklonjen u prvom stupnju predobrade. Vidljivo je da uvjeti kiselinske hidrolize nisu bili dovoljno žestoki da bi se narušila kristaliničnost celuloze i glukan otopio u hidrolizatu, već je zaostao u čvrstoj fazi. Prisutni ostatak hemiceluloze nije hidroliziran zbog kovalentnih veza u strukturi te je prikazan kao ksilan. Najmanje ksilana, ali i zaostalog lignina, ima u čvrstoj fazi koja je bila predobrađena sulfatnom kiselinom, stoga se može zaključiti da je ova kiselina najučinkovitija za uklanjanje hemiceluloze i lignina prije obrade organosolv metodom te je zbog toga bila poboljšana i enzimska hidroliza predobrađene biomase.

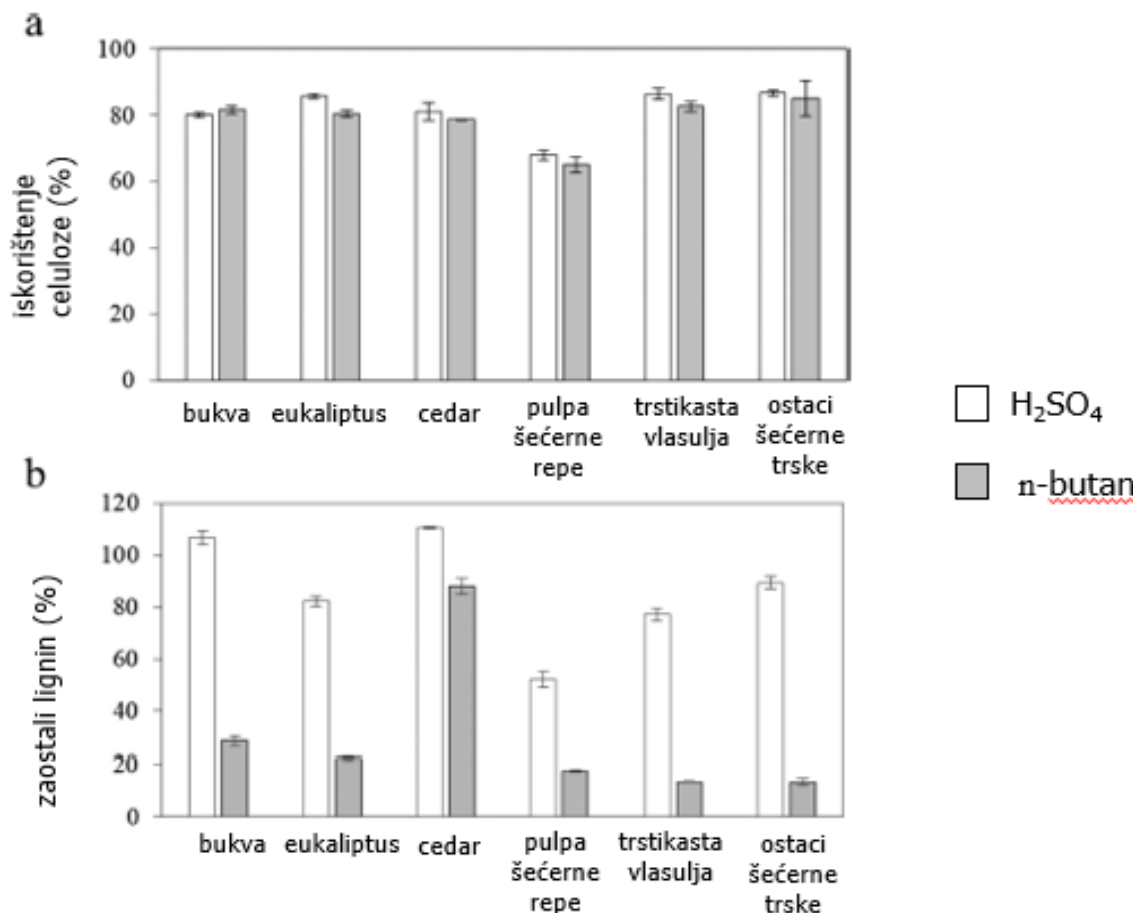


**Slika 8.** Sastav hidrolizata bukve nakon nekatalizirane i kiselinom katalizirane predobrade (Ibrahim i sur., 2020).



**Slika 9.** Sastav čvrste faze nakon jednostupanjnske i dvostupanjnske predobrade (Ibrahim i sur., 2020).

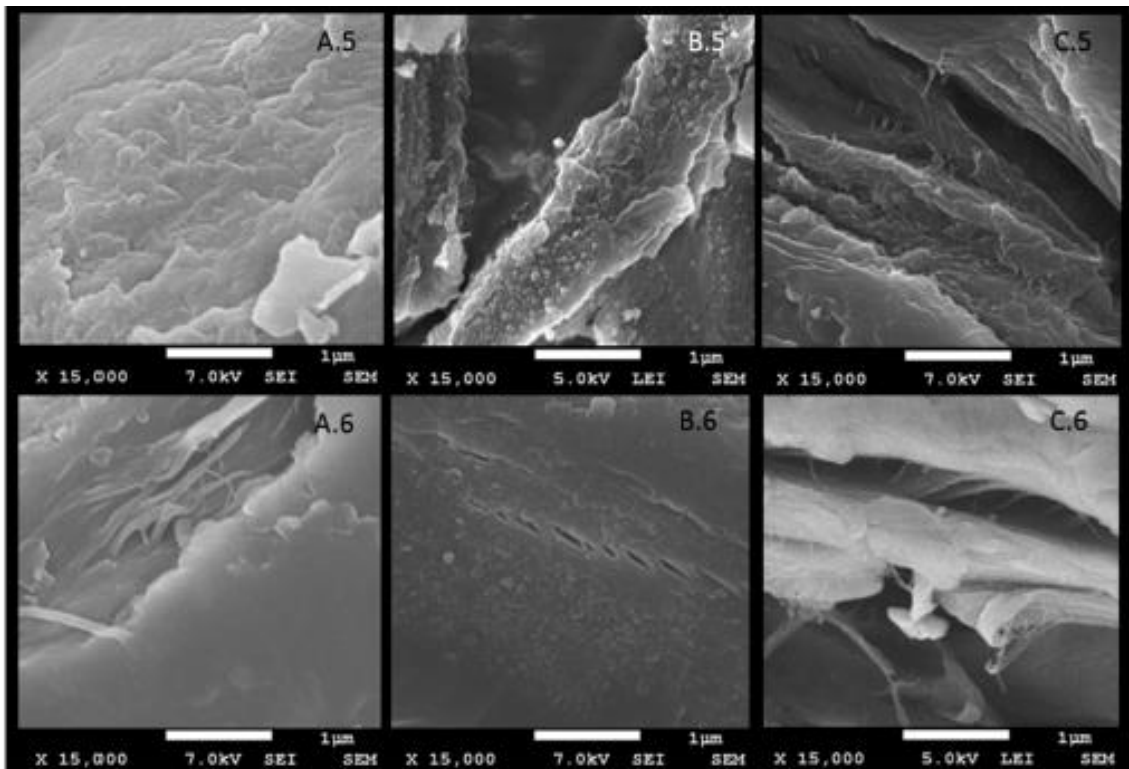
Schmetz i sur. (2019) proveli su u laboratorijskom mjerilu jednostupanjsku kiselinu hidrolizu i predobradu organskim otapalom šest različitih vrsta lignocelulozne biomase, među kojima je bio eukaliptus, kao model tvrdog drva s visokim udjelom lignina, i bukva, kao tvrdo drvo. Cilj je bio usporediti učinkovitost predobrade organosolv metodom (katalizirane dodatkom kiseline) i kiselinom predobradom kako bi se postiglo uklanjanje lignina i poboljšanje enzimske hidrolize. Pritom su korištene različite vrste biomase (tvrdo drvo, meko drvo, poljoprivredni ostatak, zeljasta biljka). Između ostalog, korištena je bukovina, usitnjena u čips veličine  $2.3 \times 1.5 \times 0.3$  cm te osušena ( $50\text{ }^{\circ}\text{C}/24\text{ h}$ ). U reaktor je stavljeno 6 g biomase suspendirane u 80 mL 1% v/v  $\text{H}_2\text{SO}_4$  za kiselinu hidrolizu odnosno 20:60 mL otopine n-butanol/  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1% v/v za organosolv metodu. Obje predobrade provedene su pri temperaturi  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 45 minuta. Dobivene frakcije su ohlađene te su razdvojene tekuća i čvrsta faza i provedena je analiza čije rezultate grafički prikazuje Slika 10.



**Slika 10.** Iskorištenje (%) : a) celuloze i b) zaostalog lignina nakon predobrade razrijeđenom kiselinom i organskim otapalom (Schmetz i sur., 2019).

Neovisno o vrsti biomase, nema značajnijih razlika u iskorištenju celuloze primjenom kiseline i organskog otapala. U bukvi i eukalptusu kod obje metode hidrolizirano je 15 – 20% celuloze. Predobrađeni uzorci korišteni su potom za enzimsku hidrolizu te se pokazalo da je ona značajno poboljšana dodatkom *n*-butanola u odnosu na razrijeđenu kiselinu.

*n*-butanol značajno poboljšava delignifikaciju u usporedbi s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, što je posebno vidljivo kod tvrdog drva, odnosno bukve i eukalptusa. Udjeli zaostalog lignina veći od 100% vjerojatno su zabilježeni zbog nastanka netopljivog pseudolignina dehidracijom celuloze i hemiceluloze tijekom kiseline predobrade.



**Slika 11.** Učinak predobrade na površinu biomase(Schmetz i sur., 2019):

**(5)** eukalptus **(6)** bukva

**A.** sirovina, **B.** čvrsta faza koja zaostaje nakon predobrade kiselinom,

**C.** čvrsta faza koja zaostaje nakon predobrade *n*-butanolom

Učinak predobrade na površinu biomase provjeren je skenirajućim elektronskim mikroskopom (Slika 11). Kod eukalptusa je nakon predobrade kiselinom uočen veliki dio površine prekriven kapljicama. Pretpostavlja se da je toplina primijenjena prilikom predobrade dovoljna da rastopi lignin koji potom migrira kroz strukturu i na površini stvara kapljice. Predobrada *n*-butanolom otkriva unutarnje strukture koje nisu vidljive kod sirovine. U uzorku bukve vidljiva su strukturna vlakna već prije predobrade što je vjerojatno posljedica razbijanja strukture tijekom usitnjavanja sirovine u čips. Na površini bukve obrađenoj kiselinom vidljivo



je manje kapljica lignina u odnosu na uzorak eukaliptusa, a razlog tome je što bukva sadrži manje lignina topljivog u kiselini.

Kundu i sur. (2021) proveli su jednostupanjsku kiselinsku hidrolizu tvrdog i mekog drveta peroctenom kiselinom. Cilj je bio pronaći prikladan način za poboljšanje delignifikacije drvene biomase, odnosno uklanjanje što više lignina uz očuvanje što više ugljikohidrata, pri niskoj temperaturi reakcije. Kao sirovine koje spadaju u tvrdo drvo korištene su dvije vrste eukaliptusa, *Eucalyptus regnans* i *Eucalyptus delegatensis*. Piljevina je osušena na zraku, usitnjena na čestice veličine 0.5 – 0.85 mm. Peroctena kiselina pripravljena je miješanjem vodikovog peroksida i octene kiseline u omjeru 1:1 v/v u prisustvu 1% w/w H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao kiselinskog katalizatora, a zatim je razrijeđena deioniziranom vodom u omjeru 3:7 v/v. Za predobradu je pomiješano 10 g suhe tvari biomase i 200 mL otopine peroctene kiseline te je odrađena pri 90 °C. Istražena su različita vremena trajanja predobrade (30 minuta te 1, 2, 3, 4 i 5 sati). Osim toga, provedena je i kiselinska hidroliza potpomognuta mikrovalovima s 0.5 g biomase i 10 mL otopine peroctene kiseline u trajanju 10, 20, 30 min i 1 h. Rezultati predobrade tvrdog drva peroctenom kiselinom prikazani su u Tablici 6.

**Tablica 6.** Sastav tvrdog drva prije i nakon predobrade peroctenom kiselinom (Kundu i sur., 2021).

Trajanje predobrade	sirovina	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
glukan (%)	40.51	59.57	66.30	67.69	69.53	72.14	73.78
ksilan (%)	22.12	18.22	16.09	14.09	13.37	12.18	11.40
arabinan (%)	1.06	1.68	1.7	1.63	1.61	1.53	1.39
LTK (%)	29.65	11.67	9.53	7.58	5.98	5.01	4.80
LNTK (%)	2.59	2.19	2.26	1.16	1.19	1.14	1.05

LTK – lignin topljiv u kiselini

LNTK – lignin netopljiv u kiselini

Udio glukana značajno je porastao produljenjem trajanja procesa te je najveći nakon 5 h dok na delignifikaciju produljenje iznad 3 h nije imalo bitnijeg utjecaja. Na temelju toga zaključeno je da je predobrada peroctenom kiselinom u trajanju 5 h najbolja za visoko iskorištenje glukana i delignifikaciju. Nakon kiselinske predobrade potpomognute mikrovalovima, kod tvrdog drva je došlo do manjeg uklanjanja lignina. Da bi se postigla jednaka učinkovitost pri niskoj temperaturi, kao što je 90 °C, potrebno je dulje trajanje procesa

od vremena ispitanih u navedenom istraživanju. Kod mekog drva je delignifikacija sporija nego kod tvrdog, što odgovara činjenici da meko drvo sadrži više lignina. Namjera autora ovog rada (Kundu i sur., 2021) je prenošenje ovog procesa u veće mjerilo i primjena ovako obrađene biomase za proizvodnju 5-klorometilfurfurala i levoglukozena.

Simon i sur. (2013) proveli su jednostupanjsku predobradu bukve mravljom i octenom kiselinom. Cilj istraživanja bio je optimizirati proces radi postizanja što bolje delignifikacije. Octena kiselina služila je kao otapalo za hemicelulozu i lignin, dok je mravlja kiselina katalizator za razaranje kompleksa lignina s ugljikohidratima. Bukva je usitnjena u čips i osušena do konačnog udjela vlage  $12 \pm 2\%$ , a zatim samljevena na veličine čestica 4 mm. Predobrada je provedena pri atmosferskom tlaku pri različitim temperaturama i vremenima (Tablica 7) kako bi se istražio utjecaj temperature i vremena na uspješnost delignifikacije. Prije same predobrade, čestice bukve bile su 30 min potopljene u otopinu vode, mravlje i octene kiseline (20:30:50 v/v) na 50 °C, u omjeru tekućine i suhe tvari 25:1. Nakon predobrade, tekuća i kruta faza odijeljene su filtracijom.

Rezultati predobrade prikazani su u Tablici 7. Delignifikacija je izražena kao omjer mase lignina uklonjenog predobradom i mase lignina u sirovini. Ustanovljeno je da i trajanje predobrade i temperatura imaju značajan utjecaj na delignifikaciju. Povećanje oba parametra dovelo je do poboljšanja delignifikacije te je u žešćim uvjetima veći udio lignina otopljen u tekućoj fazi. Maksimalna delignifikacija postignuta je pri najvećoj temperaturi uz najdulje trajanje procesa. Također je uočeno da kraće vrijeme obrade pri većoj temperaturi daje bolje rezultate nego dulje trajanje pri manjoj temperaturi predobrade. Iskorištenje čvrste faze izračunato je kao omjer ukupne suhe tvari u čvrstoj fazi nakon predobrade i ukupne suhe tvari sirovine. Iz Tablice 7 je vidljivo da temperatura i vrijeme na iskorištenje čvrste faze djeluju obrnuto nego na delignifikaciju. Povećanje temperature i trajanja, pri čemu je bolja delignifikacija, dovodi do slabijeg iskorištenja čvrste faze jer u žešćim uvjetima više hemiceluloze i lignina hidrolizira i otapa se u tekućoj fazi. Najbolje iskorištenje postignuto je kod duljeg trajanja procesa pri nižoj temperaturi. Razgradni proizvodi koji su nastali ovom predobradom su furfural i HMF, ali je HMF prešao u furfural, stoga je prikazana samo njegova koncentracija. Na nastajanje furfurala također utječu oba parametra procesa, iako temperatura ima veći utjecaj nego trajanje. Najviše furfurala nastalo je pri najvišoj temperaturi predobrade. Na temelju dobivenih rezultata i kriterija da je iskorištenje čvrste faze jednako važno kao i delignifikacija, provedena je optimizacija predobrade bukovine mravljom i octenom kiselinom. Zaključeno je da su optimalni uvjeti temperatura 104.2 °C i trajanje 5 h i 7 min pri čemu se postiže 70.5% delignifikacije i 58.7% iskorištenja čvrste faze (Simon i sur., 2013).

**Tablica 7.** Rezultati kiselinske predobrade bukve mravljom i octenom kiselinom (Simon i sur., 2013).

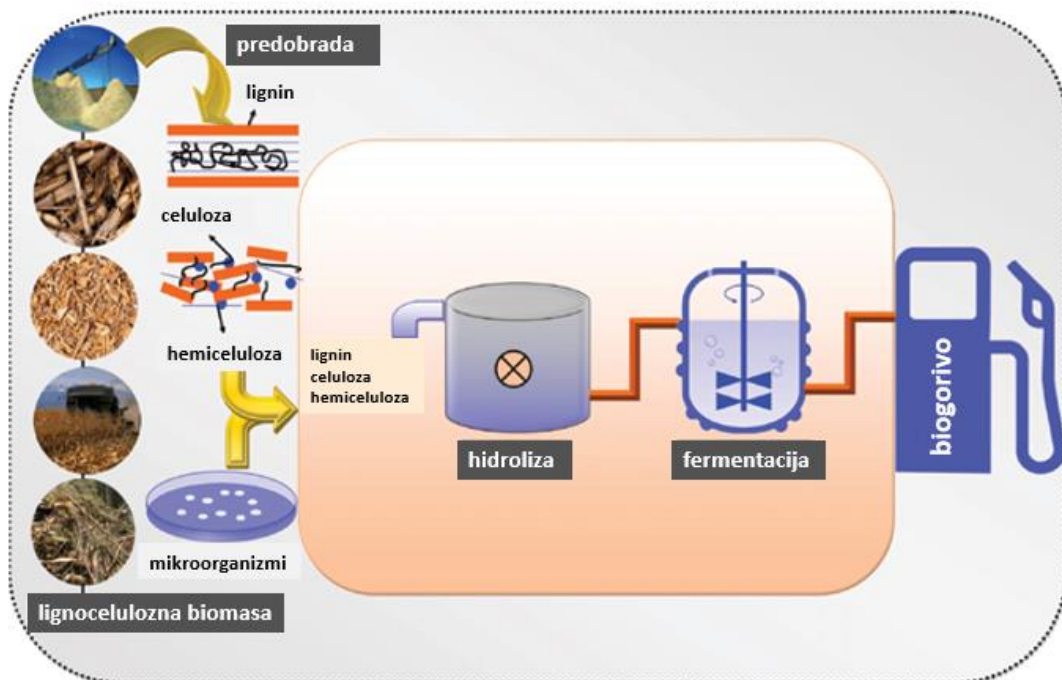
eksperiment	vrijeme	temperatura ( °C)	delignifikacija (%)	iskorištenje suhe tvari	glukoza (%)	ksiloza (%)	ostali šećeri (%)	furfural (ppm)
1	5h7min	97	44.8	67.5	58.7	11.9	2.31	0.2
2	3h	83	12.3	87.3	46.9	20.8	3.27	0.2
3	3h	97	27.5	76.6	52.2	14.7	2.65	0.7
4	1h30min	87	7.0	88.8	44.3	20.4	3.73	0.1
5	53 min	97	14.8	86.6	47.3	17.1	2.53	0.2
6	1h30min	107	41.5	68.0	58.5	13.0	2.57	2.0
7	4h30min	87	16.0	84.2	48.6	16.4	3.05	0.1
8	3h	97	30.0	79.7	50.6	15.1	2.58	0.3
9	3h	97	33.9	74.9	55.2	13.9	2.64	0.2
10	3h	97	23.1	80.0	49.6	14.8	2.46	0.3
11	3h	97	34.2	74.1	43.6	11.0	2.27	1.8
12	3h	111	*	*	*	*	*	*
13	4h30min	107	75.2	55.3	73.9	9.4	2.00	20.0

\* predobrada nije provedena jer je pri atmosferskom tlaku vrelište smjese 107 °C

## 2.5. Odabrani biotehnološki proizvodi dobiveni iz bukovine

### 2.5.1. Biogoriva

Biogoriva proizvedena iz lignocelulozne biomase smatraju se ugljično neutralnom alternativom naftnim gorivima u energetskom i prometnom sektoru. Mogu se podijeliti na tekuća biogoriva (bioetanol, bio-ulje, biodizel, biobutanol, i sl.) i plinovita biogoriva (bioplin, sintetski plin, biovodik i sl.). Ova goriva mogu se proizvesti termokemijskim ili biokemijskim putevima. Biokemijska pretvorba obično uključuje enzimsku hidrolizu, fermentaciju i anaerobnu digestiju (Okolie, 2020). Proizvodnja je shematski prikazana na Slici 12. Biogoriva se mogu proizvesti iz jestive biomase (kao što su kukuruz ili melasa) te tada govorimo o biogorivima prve generacije, dok se biogoriva proizvedena iz nejestive biomase nazivaju gorivima druge generacije (Lu i sur., 2013).



**Slika 12.** Proizvodnja biogoriva iz lignocelulozne biomase (Fatma i sur., 2018).

#### 2.5.1.1. Bioetanol

Bioetanol se proizvodi iz biomase enzimskom hidrolizom i mikrobnom fermentacijom šećera. Može se miješati s benzinom i koristiti kao transportno gorivo. Sadrži oko 35% kisika što poboljšava njegovo sagorijevanje i smanjuje emisiju stakleničkih plinova. Nedostatak bioetanola je da zbog prisutnosti kisika može postati korozivan za motor vozila. Proizvodnja

bioetanola iz lignoceluloznih sirovina privlači sve više pažnje jer je povoljan za proizvodnju i upotrebu i s ekološkog i ekonomskog stajališta (Okolie, 2020). Romaní i sur. (2013) proizveli su bioetanol iz drva eukaliptusa (*Eucalyptus globulus*) fermentacijom s kvascem *Saccharomyces cerevisiae* CECT-1170. Ovaj soj kvasca fermentira glukozu, galaktozu i maltozu. Čips eukaliptusa predobradili su eksplozijom vodene pare bez dodatka katalizatora, a zatim su proveli enzimsku hidrolizu predobrađene čvrste faze pomoću celulaza i  $\beta$ -glukozidaza. Na kraju fermentacije postignuta je koncentracija bioetanola  $51 \text{ g L}^{-1}$ , a prinos procesa iznosio je 91% teorijskog što su vrlo zadovoljavajući rezultati.

Lee i Yu (2020) proveli su proizvodnju bioetanola iz bagrema koji je prethodno obrađen kiselinom hidrolizom i hidrotermalnom predobradom pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* 24858 ATCC. Drvo bagrema usitnjeno je i jedan dio je predobrađen razrijeđenom sumpornom kiselinom (8% w/w), a drugi hidrotermalnom predobradom te je nakon predobrade čvrsta faza ponovno samljevena kako bi se enzimima povećala dostupnost. Enzimsku hidrolizu provedena je komercijalnim enzimima, a zatim je slijedila fermentacija. Predobrada razrijeđenom kiselinom pokazala se učinkovitijom od hidrotermalnog tretmana. Iskorištenje fermentacije iznosilo je 94.9%.

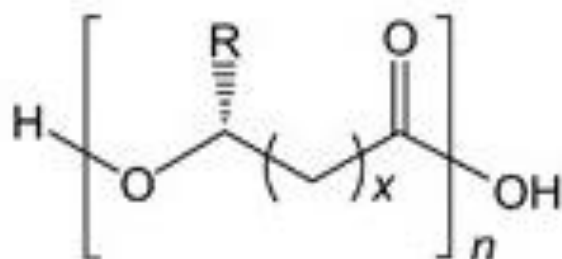
#### 2.5.1.2. Biobutanol

Biobutanol zbog svojih svojstava postaje sve rašireniji kao zamjena bioetanolu. Sadrži čak 30% više energije od bioetanola. Može se koristiti u čistom obliku ili pomiješan s benzinom za upotrebu u postojećim motorima vozila bez potrebe za mehaničkim promjenama. Siguran je za korištenje i nije korozivan (Okolie, 2020). Lu i sur. (2013) proizveli su butanol iz hidrolizata mješavine tvrdih vrsta drveta (pretežito javora, bukve i breze). Drvena pulpa pripremljena je kuhanjem, pranjem i ekstrakcijom hemiceluloze i lignina u lužini koja se inače koristi za pripremu pulpe u proizvodnji papira. Otopljeni lignin i hemiceluloza zatim su hidrolizirani sumpornom kiselinom kako bi se oslobodili šećeri, uglavnom glukozu i ksiloza. Iz pulpe su uklonjeni inhibitori. Fermentacija je provedena bakterijom *Clostridium beijerinckii* CC101. Rezultati su pokazali da uklanjanje inhibitora povećava prinos procesa za 63% te je dobiveno  $11.35 \text{ g L}^{-1}$  biobutanola. Također, uklanjanje plinova oslobođenih tijekom fermentacije smanjilo je toksično djelovanje butanola na mikroorganizam te je prinos procesa dodatno povećan.

## 2.5.2. Polihidroksialkanoati

Polihidroksialkanoati (PHA) su mikrobnii poliesteri koji se smatraju alternativom petrokemijskim sintetskim polimerima. Opća kemijska formula PHA prikazana je na Slici 13. Sintetiziraju se i akumuliraju kao intracelularne granule u nekim vrstama bakterija kojima služe kao zalihe ugljika i energije (Obruca i sur., 2015). Svojstva PHA su elastičnost, termoplastičnost, hidrofobni su i nisu topljivi u vodi, nisu toksični i biorazgradivi su (Rezić, 2012). Nedostatak su visoki troškovi proizvodnje zbog čega je fokus na traženju jeftinih fermentabilnih sirovina. Najčešće se proizvodi poli(3-hidroksibutirat) (PHB). Proizvodnja zahtijeva samo tri enzima:  $\beta$ -ketotiolazu, acetoacetyl-CoA reduktazu i PHA sintazu (Salamanca-Cardona i sur., 2013). Salamanca-Cardona i sur. (2013) su na ksilanu izoliranom iz bukovine proizveli PHA uz pomoć genetički modificirane bakterije *Escherichia coli*. Nekoliko ranijih istraživanja pokazalo je da upotreba ksiloze umjesto glukoze kao izvora ugljika za rast *E. coli*, dovodi do poboljšanja poželjnih svojstava ovakvih polimera. Efikasnost procesa sekrecije PHA iznosila je preko 90%, ali je prinos nizak kada se kao izvor ugljika koristi ksilan u odnosu na prinos dobiven korištenjem monomernih šećera.

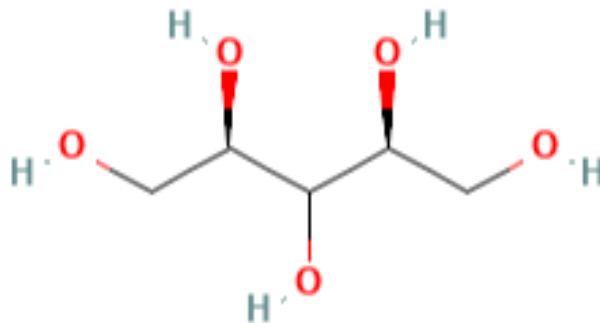
U literaturi su navedeni još neki mikroorganizmi kao prikladni producenti PHA, npr. *Ralstonia eutropha* (Reinecke i Steinbüchel, 2009) i vrste iz porodice ljubičastih nesumpornih bakterija (Monroy i Buitrón, 2020) na sirovinama kao što su otpadne vode, ali nema dostupne literature o njihovoj primjeni na drvnim sirovinama što bi bilo zanimljivo istražiti.



**Slika 13.** Opća kemijska formula polihidroksialkanoata (Li i sur., 2016).

### 2.5.3. Ksilitol

Ksilitol je spoj koji se može koristiti kao alternativa saharozi u sladilima za hranu i farmaceutskoj industriji, u žvakaćim gumama i zubnim pastama jer djeluje antikariogeno, a pogodan je za dijabetičare. U prirodi se može naći u voću i povrću, koje zbog malih prisutnih količina nije prikladno za njegovu izolaciju. Trenutno se uobičajena proizvodnja ksilitola kemijskom redukcijom ksiloze i njezinih derivata u lužnatom mediju (Okolie i sur, 2020). Kemijsku strukturu ksilitola prikazuje Slika 14. Dalli i sur. (2017) u svom radu proizveli su ksilitol iz hidrolizata drva topole uz pomoć novog soja kvasca *Candida tropicalis* UFMG BX 12-a koji do tada još nije bio korišten u tu svrhu. Drvo topole obrađeno je najprije parom kako bi se dobio predhidrolizat hemiceluloze koji je zatim hidroliziran razrijeđenom razrijeđenom sumpornom kiselinom (1.8% w/w) 4 h pri 120 °C. Iz hidrolizata su uklonjeni inhibitori furfural, octena kiselina i HMF. Pripremljen je i sintetički hidrolizat istog sastava koji je služio kao kontrola. Kvasac je imobiliziran na nosačima pripravljenim od kalcijevog alginata kako bi se povećala efikasnost procesa i smanjili troškovi izdvajanja proizvoda. Prinos fermentacije je iznosio 0.92 g g<sup>-1</sup>, a produktivnost procesa 0.88 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> tijekom 48 h, što je iznosilo 96% u odnosu na prinos odnosno 95.6% u odnosu na produktivnost kontrolne fermentacije.



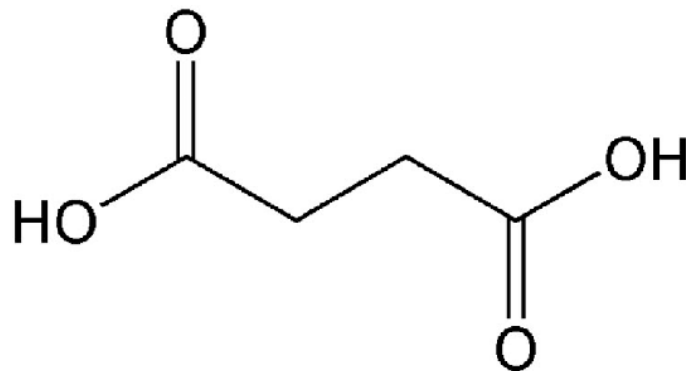
**Slika 14.** Kemijska struktura ksilitola (Anonimus 3, 2021).

Miura i sur. (2015) proizveli su ksilitol iz hidrolizata japanske bijele breze pomoću kvasca *Candida magnoliae* TISTR5663 u mikroaerofilnim uvjetima pri različitim brzinama dobave kisika. Mljeveno drvo breze je hidrolizirano sumpornom kiselinom (3% w/w) tijekom 1 h pri 120 °C te su iz njega uklonjeni inhibitori. Najbolji rezultati ostvareni su pri brzini dobave kisika od 12.6 mmol O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Prinos je iznosio 0.74 g g<sup>-1</sup>, a produktivnost 1.0 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Zaključeno je da je japanska bijela breza obećavajuća sirovina za proizvodnju ksilitola.

Ksilitol se također može proizvesti pomoću plijesni *Mucor indicus* (npr. na hidrolizatu otpadne trave (Lilek, 2020), ali nema dostupne literature o njezinoj primjeni na drvnim sirovinama.

#### 2.5.4. Jantarna kiselina

Jantarna kiselina je dikarboksilna kiselina koja se može koristiti kao zelena sirovina za proizvodnju sintetskih smola, biorazgradivih polimera i kemijskih intermedijera (Kim i sur., 2004). Na Slici 15 prikazana je kemijska struktura jantarne kiseline. Kim i sur. (2004) proveli su šaržnu i kontinuiranu fermentaciju hidrolizata hrastovine pomoću bakterije *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E u anaerobnim uvjetima. Ova bakterija izolirana je iz goveđeg buraga i posebna je po tome što, za razliku od većine ostalih bakterija, ona može istovremeno koristiti i glukozu i ksilozu. Čips hrasta predobrađen je eksplozijom parom pri 215 °C u trajanju 6 min. Tijekom fermentacije, glukozu i ksiloza su potpuno utrošene. Glavni produkt procesa bila je jantarna kiselina, dok su mravlja, octena i mliječna kiselina prisutne kao nusprodukti. Ostvareno je iskorištenje fermentacije od 63%, a produktivnost je iznosila 1.19 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.



**Slika 15.** Kemijska struktura jantarne kiseline (Wang i sur., 2020).



### 3. ZAKLJUČCI

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

1. Lignocelulozna biomasa predstavlja lako dostupan i jeftin izvor sirovina za različite biotehnološke procese.
2. Najveći izazov u korištenju lignocelulozne sirovine predstavlja uklanjanje lignina i razbijanje kristalinične strukture celuloze kako bi polisaharidi, od kojih je lignoceluloza izgrađena, postali dostupni enzimskoj hidrolizi na jednostavnije fermentabilne šećere.
3. Razvijeno je puno različitih metoda predobrade, ali ni jedna metoda nije univerzalna. Odabir prave metode ovisi o vrsti sirovine i potrebnom učinku predobrade ovisno o tome za što se tako predobrađena sirovina (hidrolizat ili čvrsta faza) želi dalje upotrijebiti. Osim toga, za odabir metode bitna je njezina cijena, jednostavnost izvedbe, trajanje i sl.
4. Predobrada lignocelulozne sirovine, tj. bukovine, koja spada u tvrdo drvo, razrijeđenom kiselinom brza je metoda koja značajno poboljšava hidrolizu hemiceluloze i celuloze. Njezin nedostatak je nastajanje razgradnih spojeva koji djeluju kao inhibitori mikroorganizama i stoga ih je potrebno ukloniti prije procesa fermentacije. Predobrada razrijeđenom kiselinom posebno je učinkovita kada se koristi u kombinaciji s još nekom drugom vrstom predobrade, kao što je organosolv metoda ili predobrada lužinom.
5. Predobrađena bukovina može se koristiti za dobivanje različitih biotehnoloških proizvoda visoke dodane vrijednosti kao što su biogoriva, ksilitol, bioplimeri i različite organske kiseline.

## 4. LITERATURA

- Adler E. (1957) Structural elements of lignin. *Ind Eng Chem* **49**(9): 1377 – 1383.
- 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 Technology* **101**(13): 4851 – 4861.
- Anonimus 1 (2021) Gljiva bijelog truljenja  
<[https://botit.botany.wisc.edu/toms\\_fungi/may97.html](https://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/may97.html)> Pristupljeno 2.rujna 2021.
- Anonimus 2 (2020) Kolonija bakterije *Bacillus subtilis*  
<<https://www.britannica.com/science/Bacillus-subtilis>> Pristupljeno 2.rujna 2021.
- Anonimus 3 (2021) Kemijska struktura ksilitola  
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Xylitol>> Pristupljeno 10. rujna 2021.
- Bajpai P. (2016). Pretreatment of lignocelulosic biomass for biofuel production. Briefs in green chemistry for sustainability, Springer.
- Batzias F. A., Sidiras, D. K. (2007) Dye adsorption by prehydrolysed beech sawdust in batch and fixed-bed systems. *Bioresource Technology* **98**(6): 1208 – 1217.
- Bektas I., Guler C., Basturk M. A., (2002) Principal mechanical properties of Eastern beech wood (*Fagus orientalis* L.) naturally grown in Andırın Northeastern Mediterranean region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **26** (3): 147 – 154.
- Bjedov L., Svoboda P., Tadin A., Habuš J., Štritof Z., Labaš N., Vucelja M., Markotić A., Turk N., Margaletić J. (2016) Utjecaj uroda sjemena obične bukve (*Fagus sylvatica* L.) na populacije sitnih glodavaca i pojavnosti hantavirusa u šumama nacionalnog parka „Plitvička jezera“ i parka prirode „Medvednca“. *Šumarski list* **9–10**: 455 – 464.
- Cadoche L., López G. D. (1989) Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biological Wastes* **30**(2): 153 – 157.
- Capolupo L., Faraco V. (2016) Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**: 9451 – 9467.
- Chen H., Zhao J., Hu T., Zhao X., Liu D. (2015) A comparison of several organosolv pretreatments for improving the enzymatic hydrolysis of wheat straw: Substrate digestibility, fermentability and structural features. *Applied Energy* **150**: 224 – 232.

Chen, H. (2014) *Biotechnology of Lignocellulose: theory and practice*. Springer, Chemical Industry Press. str. 2 – 50.

Crestini C., Melone F., Sette M., Saladino R. (2011) Milled Wood Lignin: A Linear Oligomer. *Biomacromolecules* **12**(11): 3928 – 3935.

da Silva Perez D., Guillemain A., Berthelot A., N'Guyen-The N., de Morogues F., Gomes C. (2009) Evaluation of forestry biomass quality for the production of second-generation biofuels. *Cellulose Chemistry and Technology* **44**: 2009-2019.

Dalli S. S., Da Silva S. S., Uprety B. K., Rakshit S. K. (2017) Enhanced production of xylitol from poplar wood hydrolysates through a sustainable process using immobilized new strain *Candida tropicalis* UFMG BX 12-a. *Applied biochemistry and biotechnology* **182**(3): 1053 – 1064.

Fatma S., Hameed A., Noman M., Ahmed T., Shahid M., Tariq M., Sohail I., Tabassum R. (2018). Lignocellulosic biomass: a sustainable bioenergy source for the future. < <https://www.eurekaselect.com/159257/article>> Pristupljeno 08.rujna 2021.

Faulon J.-L., Carlson G. A., Hatcher P. G. (1994) A three-dimensional model for lignocellulose from gymnospermous wood. *Organic Geochemistry* **21**(12): 1169 – 1179.

Haghighi Mood S., Hossein Golfeshan A., Tabatabaei M., Salehi Jouzani G., Najafi G. H., Gholami M., Ardjmand M. (2013) Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **27**: 77 – 93.

Harmsen P, Huijgen W, Bermudez L, Bakker R (2010) Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. Wageningen UR-Food & Biobased Research. < <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/396201> > Pristupljeno 18.08.2021.

Hrvatske šume (2017) Šumskogospodarska osnova 2016. – 2025., uređajni zapisnik, str. 473. <<https://poljoprivreda.gov.hr/istaknute-teme/sume-112/sumarstvo/sumskogospodarska-osnova-2016-2025/250>> Pristupljeno 07. rujna 2021.

Ibrahim Q., Arauzo P. J., Kruse A. (2020) The effect of using different acids to catalyze the prehydrolysis stage on the organosolv delignification of beech wood in two-stage process. *Renewable Energy* **153**: 1479-1487.

Isikgor H. F., Becer C. R. (2015) Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry* **6**: 2010-2019.

- Kan T., Strezov V., Evans T. J. (2016) Lignocellulosic biomass pyrolysis: A review of product properties and effects of pyrolysis parameters. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **57**: 1126 – 1140.
- Kim D. Y., Yim S. C., Lee P. C., Lee W. G., Lee S. Y., Chang H. N. (2004) Batch and continuous fermentation of succinic acid from wood hydrolysate by *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E. *Enzyme and Microbial Technology* **35**(6-7): 648 – 653.
- Kundu C., Samudrala S.P., Kibria M.A., Bhattacharya S. (2021) One-step peracetic acid pretreatment of hardwood and softwood biomass for platform chemicals production. *Scientific Reports* **11**(1): 11183.
- Lee I., Yu J. H. (2020) The production of fermentable sugar and bioethanol from acacia wood by optimizing dilute sulfuric acid pretreatment and post treatment. *Fuel* **275**: 117943.
- Li Z., Yang J. Loh X. (2016) Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Mater* **8**: e265.
- Lilek S. (2020) Proizvodnja i izdvajanje ksilitola iz hidrolizata otpadne trave. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Lu C., Dong J., Yang S. T. (2013) Butanol production from wood pulping hydrolysate in an integrated fermentation–gas stripping process. *Bioresource technology* **143**: 467 – 475.
- Mai C., Kües U., Militz H. (2004) Biotechnology in the wood industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**(5): 477 – 494.
- Miura M., Shimotori Y., Nakatani H., Harada A., Aoyama M. (2015) Bioconversion of birch wood hemicellulose hydrolyzate to xylitol. *Applied biochemistry and biotechnology* **176**(3): 947 – 955.
- Monroy I., Buitrón G. (2020) Production of polyhydroxybutyrate by pure and mixed cultures of purple non-sulfur bacteria: A review. *Journal of Biotechnology* **317**: 39 – 47.
- Mosier N. S., Hendrickson R., Brewer M., Ho N., Sedlak M., Dreshel R., Welch G., Dien B. S., Aden A., Ladisch M. R. (2005). Industrial Scale-Up of pH-Controlled Liquid Hot Water Pretreatment of Corn Fiber for Fuel Ethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **125**(2): 77 – 98.
- Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y. Y., Holtzaple M., Ladisch M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* **96**(6): 673 – 686.

- Nimz H. (1974) Beech Lignin - Proposal of a Constitutional Scheme. *Angewandte Chemie International Edition in English* **13**(5): 313 – 321.
- Obruca S., Benesova P., Marsalek L., Marova I. (2015) Use of lignocellulosic materials for PHA production. *Chemical and biochemical engineering quarterly* **29**(2): 135 – 144.
- Okolie J. A., Nanda S., Dalai A. K., Kozinski J. A. (2020) Chemistry and specialty industrial applications of lignocellulosic biomass. *Waste and Biomass Valorization* **12**(5): 2145 – 2169.
- Pandey A., Soccol C. R., Nigam P., Soccol V. T. (2000) Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* **74**(1): 69 – 80.
- Perić S., Medak J., Ivanković M., Marjanović H. (2006) komparativna istraživanja uspijevanja bukve u prirodnim sastojinama na 12 lokaliteta. *Šumar. inst. Izvanredno izdanje* **9**: 87 – 97.
- Putro J. N., Soetaredjo F. E., Lin S.-Y., Ju Y.-H., Ismadji S. (2016) Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. *RSC Advances* **6**(52): 46834 – 46852.
- Radojčić Redovniković I. (2020) Osvježimo znanje: Zelena otapala. *Kem. Ind.* **69**(11-12): 670 – 671.
- Reinecke F., Steinbüchel A. (2009) *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **16**(1-2): 91 – 108.
- Rezić T. (2012) Industrijska biotehnologija - proizvodnja biogoriva, biopolimera i biokemikalija. Interna predavanja, Prehrambeno - biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Romaní A., Garrote G., Ballesteros I., Ballesteros M. (2013) Second generation bioethanol from steam exploded *Eucalyptus globulus* wood. *Fuel* **111**: 66 – 74.
- 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 Biochemistry* **40**(12): 3693 – 3700.
- Salamanca-Cardona L., Ashe C. S., Stipanovic A. J., Nomura C. T. (2013) Enhanced production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from beechwood xylan by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**(2): 831 – 842.
- Sarkar N., Ghosh S. K., Bannerjee S., & Aikat K. (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy* **37**(1): 19 – 27.

- Schmetz Q., Teramura H., Morita K., Oshima T., Richel A., Ogino C., Kondo A. (2019) Versatility of a Dilute Acid/Butanol Pretreatment Investigated on Various Lignocellulosic Biomasses to Produce Lignin, Monosaccharides and Cellulose in distinct phases. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **7**: 11069 – 11079.
- Schwiderski M., Kruse A., Grandl R., Dockendorf D. (2014) Comparison of the influence of a Lewis acid AlCl<sub>3</sub> and a Brønsted acid HCl on the organosolv pulping of beech wood. *Green Chemistry* **16**(3): 1569 – 1578.
- Seidl P. R., Goulart A. K. (2016) Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2**: 48 – 53.
- Sharma A., Pareek V., Zhang D. (2015) Biomass pyrolysis—A review of modelling, process parameters and catalytic studies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **50**: 1081 – 1096.
- Simon M., Brostaux Y., Vanderghem C., Jourez B., Paquot M., Richel A. (2013) Optimization of a formic/acetic acid delignification treatment on beech wood and its influence on the structural characteristics of the extracted lignins. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **89**(1): 128 – 136.
- Strategija gospodarenja otpadom Republike Hrvatske (2005) *Narodne novine* **130** (NN 130/2005) <[https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005\\_11\\_130\\_2398.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_11_130_2398.html)> Pristupljeno 07. rujna 2021.
- Sun S., Sun S., Cao X., Sun R. (2016) The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology* **199**: 49 – 58.
- Sun Y., Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* **83**(1): 1 – 11.
- Świątek K., Gaag S., Klier A., Kruse A., Sauer J., Steinbach D. (2020) Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Sugars and Furfurals Formation. *Catalysts* **10**(4): 437.
- Taherzadeh M., & Karimi K. (2008) Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **9**(9): 1621 – 1651.
- Tomak E. D., Viitanen H., Yildiz U. C., Hughes M. (2010) The combined effects of boron and oil heat treatment on the properties of beech and Scots pine wood. Part 2: Water absorption, compression strength, color changes, and decay resistance. *Journal of Materials Science* **46**(3): 608 – 615.

- Travaini R., Martín-Juárez J., Lorenzo-Hernando A., Bolado-Rodríguez S. (2016) Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. *Bioresource Technology* **199**: 2 – 12.
- Umezawa T. (1997) Lignans. U: Biochemistry and molecular biology of wood, Higuchi T., ur., Springer-Verlag, Berlin. str. 181 – 194.
- Vek V., Oven P., Poljanšek I. (2016) Review on Lipophilic and Hydrophilic Extractives in Tissues of Common Beech. *Drvna industrija* **67** (1): 85 – 96.
- Wang H., Xia B., Lin M., Wang Y., Sun B., Li Y. (2020) Succinic acid inhibits the activity of cytochrome P450 (CYP450) enzymes. *Pharmaceutical Biology* **58**(1): 1159 – 1164.
- Wertz J.-L., Deleu M., Coppée S., Richel A. (2016) Hemicelluloses and Lignin in Biorefineries. CRC Press. str. 142.
- Yang B., Wyman C. E. (2008) Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **2**(1): 26 – 40.
- Yousuf A., Pirozzi D., Sannino F. (2020) Fundamentals of lignocellulosic biomass. U: Lignocellulosic biomass to liquid biofuels, 1. izd., Yousuf A., Pirozzi D., Sannino F., ur., Academic Press. str. 1 – 14.
- Zabed H., Sahu J. N., Suelly A., Boyce A. N., Faruq G. (2017) Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **71**: 475 – 501.
- Zhang J., Zhou H., Liu D, Zhao X. (2020) Pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification of cellulose. U: Lignocellulosic biomass to liquid biofuels, 1. izd., Yousuf A., Pirozzi D., Sannino F., ur., Academic Press. str. 17 – 55.
- Zheng Y., Shi J., Tu M., Cheng Y.-S. (2017) Principles and Development of Lignocellulosic Biomass Pretreatment for Biofuels. *Advances in Bioenergy*. str. 1 – 68.
- Zheng Y., Zhao J., Xu F., Li Y. (2014) Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science* **42**: 35 – 53.

## 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.*

*Mikaela Žugec*

---

ime i prezime studenta