

Razvoj biorafinerijskoga sustava za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz otpadnih lignoceluloznih sirovina

Marđetko, Nenad

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:159:041695>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Nenad Marđetko

**RAZVOJ BIORAFINERIJSKOGA SUSTAVA
ZA PROIZVODNJU BIOGORIVA I
BIOKEMIKA LIJA IZ OTPADNIH
LIGNOCELULOZNIH SIROVINA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Nenad Marđetko

**DEVELOPMENT OF A BIO-REFINERY
SYSTEM FOR BIOFUELS AND
BIOCHEMICALS PRODUCTION FROM
WASTE LIGNOCELLULOSE CONTAINING
FEEDSTOCKS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Nenad Marđetko

**RAZVOJ BIORAFINERIJSKOGA SUSTAVA
ZA PROIZVODNJU BIOGORIVA I
BIOKEMIKA LIJA IZ OTPADNIH
LIGNOCELULOZNIH SIROVINA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof. dr. sc. Božidar Šantek.

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Nenad Marđetko

**DEVELOPMENT OF A BIO-REFINERY
SYSTEM FOR BIOFUELS AND
BIOCHEMICALS PRODUCTION FROM
WASTE LIGNOCELLULOSE CONTAINING
FEEDSTOCKS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Božidar Šantek, PhD, Full Professor

Zagreb, 2022

Ovaj doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Božidara Šanteka u okviru znanstveno-istraživačkog projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (šifra projekta: HRZZ-IP-2018-01-9717) kojeg je voditelj prof. dr. sc. Božidar Šantek.

Božidar Šantek

Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

Tel. +358-(0)-1-4605-290

Fax.: +385-(0)-1-4836-424

e mail: bsantek@pbf.hr

Matični broj znanstvenika: 184956

Prof. dr. sc. B. Šantek je rođen u Ludbregu 27. 05. 1966. godine. Diplomirao je 1990. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 15. lipnja 1991. godine zaposlen je kao znanstveni novak u Zavodu za biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu (PBF) Sveučilišta u Zagrebu. Magistarski rad je obranio 18. 11. 1994. godine, a doktorsku disertaciju 13. 12. 1996. godine. U znanstveno-nastavno zvanje docent u Zavodu za biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu izabran je 13. 05. 1998. godine. Stručno se usavršavao na Technische Fakultät, Universität Bielefeld (Bielefeld, Njemačka) u periodu 01. 02. 2001. - 01. 12. 2002. godine kao član istraživačke grupe prof. Flaschel-a. U znanstveno-nastavno zvanje izvanredni profesor izabran je 01. 12. 2003. godine, u zvanje redoviti profesor 16. 12. 2008. godine, a u zvanje redoviti profesor u trajnom zvanju 15. 01. 2014. godine u Zavodu za biokemijsko inženjerstvo PBF-a, Sveučilišta u Zagrebu.

Za Pročelnika Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva PBF-a izabran je 2004. godine, a za Predstojnika Zavoda za biokemijsko inženjerstvo 2021. godine. Prof. dr. sc. B. Šantek vodio je (ili bio suradnik) na brojnim domaćim ili međunarodnim znanstvenih projektima, a trenutno je voditelj znanstvenog projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina” (HRZZ, br. 9717). Do sada je bio mentor dva znanstvena magistarska rada i 5 disertacija čiji rezultati su obavljeni u relevantnim znanstvenim časopisima. Dobitnik je Državne nagrade za znanost (godišnja nagrada za 2004. godinu) i nagrade R. Podhorsky HATZ za 2015. godinu. U dosadašnjem radu objavio je 62 a1 rada, 12 a2 radova i 3 a3 rada. Prof. dr. sc. B. Šantek koautor je sveučilišnog udžbenika „Biokemijsko inženjerstvo” koji je objavljen 2009. godine. Trenutni znanstveno-istraživački rad prof. dr. sc. B. Šanteka usmjeren je na ekološki i ekonomski održivu proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz obnovljivih sirovina.

„The purpose of life is not to be happy. It is to be useful, to be honorable, to be compassionate, to have it make some difference that you have lived and lived well.“

- Ralph Waldo Emerson

Prvo se zahvaljujem mentoru prof. dr.sc. Božidaru Šanteku, voditelju projekta „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“, koji mi je omogućio izradu doktorskog rada na ovom projektu, na predloženoj temi i savjetima tijekom izvođenja eksperimenata i pisanja disertacije.

Prof. dr.sc. Blaženki Kos i izv.prof.dr.sc. Nataliji Velić hvala na sugestijama pri diskusiji rezultata i svim korisnim savjetima prilikom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se kolegama doc.dr.sc. Antoniji Trontel i doc.dr.sc. Mariu Novaku na pomoći tijekom izvođenja eksperimenata te na konstruktivnim savjetima i zanimljivim diskusijama.

Želim se zahvaliti i kolegicama dr.sc. Blanki Ljubas i Marini Grubišić, mag.ing., te kolegama doc.dr.sc. Mladenu Pavlečiću i Igoru Livadi, te svim drugim članovima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na susretljivosti i prijateljskoj podršci.

Na kraju veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci koju su mi pružali tijekom mog obrazovnog puta i izrade ovog rada.

Tema doktorskog rada prihvaćena je na 1. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akademsku godinu 2020./2021. održanoj dana 28. studenog 2020. godine u Zagrebu, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija 18. svibnja 2021. godine na 10. sjednici u 352. akademskoj godini (ak. god. 2020./2021.).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo

UDK: 547.458.84:662.754:604.2:661.722(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

RAZVOJ BIORAFINERIJSKOGA SUSTAVA ZA PROIZVODNJU BIOGORIVA I BIOKEMIKALIJA IZ OTPADNIH LIGNOCELULOZNIH SIROVINA

Nenad Marđetko, mag. ing.

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor : prof. dr. sc. Božidar Šantek

Kratki sažetak:

Biorafinerije su postrojenja za pretvorbu obnovljive biomase u različite kemikalije, materijale i goriva. Cilj biorafinerija je maksimalno iskorištavanje svih sastojaka biomase za proizvodnju primarnih i različitih sekundarnih proizvoda veće dodane vrijednosti. U ovom istraživanju razvijen je novi održivi biorafinerijski sustav za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz otpadnih lignoceluloznih sirovina. Primjenom fizikalno-kemijskih i enzimskih metoda provedena je uspješna predobrada različitih lignoceluloznih sirovina. U hranjivim podlogama dobivenima nakon kiselinske hidrolize kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru i enzimske hidrolize predobrađenih kukuruznih oklasaka provedeni su bioproceti s plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u tri laboratorijska bioreaktora različitih konstrukcija, te su proizvedene biokemikalije kao što su etanol, ksilitol i glicerol. Dodatno, nusproizvodi pojedinih postupaka proizvodnje enzima ili baznih kemikalija, kao što su tekući ostaci hranjivih podloga i biomasa plijesni, korišteni su za proizvodnju biomase nesumpornih ljubičastih bakterija (izolacija pigmenata) i izopropanola, te za izolaciju biomaterijala (hitina, hitozana i masnih kiselina) podupirući dodatno biorafinerijski sustav proizvodnje različitih bioproizvoda, a težeći principu tzv. „zero waste“ biorafinerije. Materijalnom bilancom je ustanovljeno da su za proizvodnju 1 kg etanola potrebna 7,48 kg kukuruznih oklasaka i 150,35 L 0,5% sumporne kiseline. Osim etanola dobiveno je i 2,39 kg izopropanola i 1,27 kg octene kiseline, dok je iz biomase plijesni i bakterija moguće izolirati 0,21 kg hitina, 0,14 kg hitozana, 0,18 kg masnih kiselina i 6,73 g pigmenata.

Broj stranica: 256

Broj slika: 56

Broj tablica: 33

Broj litetaturnih navoda: 247

Broj priloga: 10

Jezik izvornika: hrvatski

Glavne riječi: biorafinerija, predobrada lignocelulozne sirovine, lignocelulolitički enzimi, bioetanol, biokemikalije, *Mucor indicus* DSM 2185, povećanje mjerila, izolacija proizvoda bioproceta, ekstrakcija tekuće

Datum obrane: 01.06 2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos
2. doc. dr. sc. Mario Novak
3. izv. prof. dr. sc. Natalija Velić

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb, i Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

PhD thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering

UDK: 547.458.84:662.754:604.2:661.722(043.3)

Scientific Area: Biotechnical sciences

Scientific Field: Biotechnology

DEVELOPMENT OF A BIO-REFINERY SYSTEM FOR BIOFUELS AND BIOCHEMICALS PRODUCTION FROM WASTE LIGNOCELLULOSE CONTAINING FEEDSTOCKS

Nenad Marđetko, MSc

Thesis performed in Laboratory for biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology at Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb

Supervisor: Božidar Šantek, PhD, Full Professor

Short abstract:

Biorefineries are plants used for the conversion of renewable biomass into various chemicals, materials, and fuels. The goal of biorefineries is the maximum utilization of all biomass components to produce primary and various secondary products of higher added value. In this research, a new sustainable biorefinery system for the production of biofuels and biochemicals from waste lignocellulosic raw materials was developed. Pre-processing of various lignocellulosic raw materials was performed using physio-chemical and enzymatic methods. In the substrates, obtained after acid hydrolysis of corn cobs in a high-pressure reactor and enzymatic hydrolysis of pre-treated corn cobs, bioprocesses were performed using *Mucor indicus* DSM 2185 as the working microorganism in three different types of laboratory bioreactors, which resulted in the production of different biochemicals such as bioethanol, xylitol, and glycerol. In addition, by-products of certain processes like the by-products of the enzyme production process or chemical production processes, such as waste media and mold biomass were respectively used, for the production of non-sulfur purple bacteria biomass (pigment isolation) and isopropanol production, and for different biomaterial isolation (chitin, chitosan, and fatty acids) which contributed to the approach of producing a range of different organic products, and striving for the principle of so-called zero waste biorefineries. The material balance established that the production of 1 kg of ethanol requires 7,48 kg of corn cobs and 150,35 L of 0.5% sulfuric acid. In addition to ethanol, it is possible to obtain 2.39 kg of isopropanol and 1.27 kg of acetic acid. From the mold and bacterial biomass, it is possible to isolate 0.21 kg of chitin, 0.14 kg of chitosan, 0.18 kg of fatty acids, and 6.73 g of pigments.

Number of pages: 256

Number of figures: 66

Number of tables: 33

Number of references: 247

Original in: Croatian

Keywords: biorefinery, pre-treatment of lignocellulosic biomass, lignocellulolytic enzyme production, bioethanol, biochemicals, *Mucor indicus* DSM 2185, scale-up, bioprocess product isolation, liquid-liquid extraction

Date of the thesis defence: 01.06.2022.

Reviewers:

1. Blaženka Kos, PhD, Full professor
2. Mario Novak, PhD, Assistant professor
3. Natalija Velić, PhD, Associate professor

Thesis is deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb, and University of Zagreb, Trg maršala Tita 14.

SAŽETAK

Biorafinerije su postrojenja za preradu obnovljive biomase u humanu ili stočnu hranu, različite kemikalije i materijale, odnosno goriva pomoću širokog spektra tehnologija. Proizvodnjom više proizvoda biorafinerije koriste različite sastojake biomase, čime dolazi do njenog maksimalnog iskorištavanja. Ciljevi ove disertacije bili su:

1. Utvrditi utjecaj enzimskih pripravaka i/ili enzima radnih mikroorganizama za proizvodnju biogoriva i biokemikalija na učinkovitost enzimske hidrolize predobrađenih lignoceluloznih sirovina,
2. Utvrditi optimalne uvjete vođenja bioprocasa, odnosno procesa izdvajanja i pročišćavanja proizvoda tih bioprocasa u sklopu biorafinerijskog sustava,
3. Utvrditi efikasnost biorafinerijskog sustava za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz otpadnih lignoceluloznih sirovina.

Provedene su predobrade lignoceluloznih sirovina (pšenična slama, otpadna trava, kukuruzovina i kukuruzni oklasci) u visokotlačnom reaktoru s 0,5% m vol⁻¹ sumpornom kiselinom pri temperaturama 160°C, 180°C i 200°C i vremenima zadržavanja (t_z) 1 min, 5 min i 10 min. Temperatura 180°C pokazala se kao optimalna za provođenje procesa. Najveća ukupna masa šećera u tekućoj fazi od 148,1 g dobivena je nakon predobrade kukuruznih oklasaka pri $t_z = 10$ min, dok su pri ostalim t_z od 1 min i 5 min dobivene nešto manje mase od 100,67 g i 115,42 g šećera. Predobradom otpadne trave dobivene su mase ukupnih ugljikohidrata 123,5 g, 106 g i 112,2 g. Predobradom pšenične slame pri ovim uvjetima ukupna masa šećera kretala se u rasponu od 62,69 g do 110,89 g, a predobradom kukuruzovine masa svih šećera prisutnih u tekućoj fazi bila je u rasponu od 87,46 g do 121,67 g. Povećanjem vremena zadržavanja i temperature dolazi do rasta mase ukupnih šećera. U svim tekućim kiselinskim hidrolizatima najveći je bio maseni udio ksilana, praćen udjelom arabinana dok je najmanji bio udio glukana. Povećanjem temperature i vremena zadržavanja povećavaju se koncentracije inhibitora bioprocasa. Maksimalne koncentracije furana zabilježene su pri temperaturi 200°C, te su se ovisno o sirovini, kretale u rasponu od 469,21 mg L⁻¹ do 1684,45 mg L⁻¹. Pri istoj temperaturi zabilježene su i najveće koncentracije octene i mravlje kiseline, i to između 0,59 g L⁻¹ i 4,69 g L⁻¹ octene kiseline te od 0,79 g L⁻¹ do 1,86 g L⁻¹ mravlje kiseline. Pod utjecajem visoke temperature pri predobradi od 200°C zabilježena je i prisutnost levulinske kiseline u rasponu od 0,04 g L⁻¹ do 0,40 g L⁻¹.

Analizom sastava svih krutih faza dobivenih nakon kiselinske predobrade lignoceluloznih sirovina, kao sirovina u ekperimentima enzimske hidrolize odabrani su predtretirani kukuruzni oklasci (PKO) dobiveni nakon predobrade na 180°C i t_z 10 min, zbog niskog masenog udjela ksilana ($w_{ksi}=1,11 \pm 0,07\%$) i visokog masenog udjela glukana ($w_{glc}=55,58 \pm 3,48\%$). Na temelju provedenih eksperimenata najveći stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata 40 g L⁻¹ PKO od 84,88% dobiven je pomoću kombinacije enzima 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5% vol vol⁻¹ Viscozyme L. Korištenjem DesignExpert programa na osnovi dobivenih rezultata kao optimalni volumni udio enzima, za postizanje maksimalnog stupnja hidrolize ukupnih ugljikohidrata od 92,66%, dobiveno je 2% Cellulase, enzyme blend i 5,18% Viscozyme L. Povećanje koncentracije enzima iznad navedenih vrijednosti ne doprinosi povećanju stupnja hidrolize ukupnih ugljikohidrata niti značajnom smanjenju vremena hidrolize. Zbog relativno visoke cijene enzima provedena je proizvodnja enzimskih koktela koristeći 7 različitih plijesni i 4 različita medija. Najveću aktivnost i najširi spektar proizvedenih enzima među ispitivanim sojevima pokazale su plijesni iz roda *Fusarium*.

Provedeni su i preliminarni uzgoji genetički modificiranog kvasca *S. cerevisiae* Y9 i plijesni *M. indicus* DSM 2185, u kojima se plijesan pokazala kao bolji proizvođač etanola u korištenim uvjetima uzgoja. Ujedno su provedeni i uzgoji odabranog radnog mikroorganizma *M. indicus* DSM 2185 u podlogama s različitim izvorima dušika, u kojima se kao najbolji izvor dušika pokazala kukuruzna močevina jer su postignuti najveći prinosi etanola koji su varirali od 5,3 g L⁻¹ do 7,3 g L⁻¹. Nakon uzgoja iz suhe biomase plijesni izolirane su i identificirane masne kiseline. Udio masnih kiselina u biomasi plijesni kretao se u rasponu od 0% do 40,25%. Ukupno su detektirane 22 masne kiseline, od kojih su najzastupljenije bile oleinska, palmitinska, linoleoidna i linolna kiselina. Na tekućim ostacima hranjivih podloga dobivenih nakon uzgoja *M. indicus* provedeni su uzgoji ljubičaste nesumporne bakterije *R. adriaticum* DSM 2781, te je proizvedeno od 0,37 g L⁻¹ do 0,798 g L⁻¹ biomase; od 3,70 do 60,12 mg g⁻¹ ukupnih pigmenata i 1,02 g L⁻¹ izopropanola.

Kod simultane saharifikacije i fermentacije plijesni *M. indicus* DSM 2185 uz dodatak 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyne blend i 5.18% vol vol⁻¹ Viscozyme L u Erlenmayerovim tikvicama, najuspješniji bioproces, u kojem je ostvarena produktivnost proizvodnje etanola od 0,312 g L⁻¹ h⁻¹ proveden je na podlozi koja je sadržavala predobrađene kukuruzne oklaske i CSL (MHP) pri 30°C. Smanjenje i povećanje temperature procesa dovelo je do znatnog smanjena produktivnosti proizvodnje etanola simultanom saharifikacijom i fermentacijom.

Proces proizvodnje etanola prenesen je u veće mjerilo te su provedeni uzgoji u bioreaktoru s mješalom, barbotirajućoj koloni i horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB). Najveća produktivnost proizvodnje etanola na sirovom blago kiselom hidrolizatu kukuruznih oklasaka dobivena je u bioreaktoru s mješalom te je iznosila $0,143 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, dok je maksimalan prinos biomase od $7,51 \text{ g L}^{-1}$ dobiven u barbotirajućoj koloni. Kada je kao podloga korišten enzimski hidrolizat predobrađenih kukuruznih oklasaka, bioproces vođen u barbotirajućoj koloni pokazao se kao najuspješniji te je postignuta produktivnost proizvodnje etanola od $0,270 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. U ovom bioreaktorskom sustavu je postignut i maksimalan prinos biomase od $7,99 \text{ g L}^{-1}$. Na tekućem ostatku hranjivih podloga dobivenim nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s mješalom uspješno je proveden uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s mješalom, te je proizvedeno $2,26 \text{ g L}^{-1}$ biomase i $14,62 \text{ mg g}^{-1}$ ukupnih pigmenata. Bakterija je još proizvela i octenu kiselinu, odnosno izopropanol, pri čemu se su produktivnosti iznosile $0,034 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ odnosno $0,065 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Proces simultane saharifikacije i fermentacije je također prenesen u veće mjerilo te je ostvarena produktivnost etanola od $0,004 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, dok se skraćivanjem trajanja procesa postigla produktivnost proizvodnje etanola od $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Prilikom ekstrakcije etanola u sustavu tekuće-tekuće primijenjeni ekstraktanti (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohol) pokazuju sposobnost razdvajanja na dvije faze, ekstrakt i rafinat, što ih čini pogodnima za ekstrakciju fermentiranih podloga koje sadrže etanol. U šaržnoj ekstrakciji etanola kod primjene sustava tekuće tekuće kao najpovoljnije otapalo pokazao se pentan-1-ol za koji bi bila potrebna tri stupnja ekstrakcije (postignuta učinkovitost od 75,21%), dok bi za provođenje kontinuirane ekstrakcije uz ulazni tok podloge u ekstraktor od 1000 kg h^{-1} koncentracije etanola od $0,063 \text{ kg kg}^{-1}$, najmanji protok otapala od 450 kg h^{-1} bio bi potreban za pentan-1-ol. Za izdvajanje ksilitola kristalizacijom iz vodene otopine i iz blago kiselog hidrolizata kukuruznih oklasaka korišteni su etanol, aceton i izopropanol. Najveće iskorištenje postupka kristalizacije ksilitola iz vodene otopine postignuto je uz upotrebu acetona i iznosi 30,95%, a iz hidrolizata otpadne trave uz upotrebu etanola i iznosi 17,87%. Iz biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185 dobivene nakon uzgoja u različitim bioreaktorskim sustavima izolirani su hitin i hitozan. Prinosi izoliranog hitina i hitozana varirali su od $0,08 \text{ g g}^{-1}$ do $0,22 \text{ g g}^{-1}$ hitina odnosno od $0,07 \text{ g g}^{-1}$ do $0,16 \text{ g g}^{-1}$ hitozana.

Ključne riječi: biorafinerija, predobrada lignocelulozne sirovine, lignocelulolitički enzimi, bioetanol, biokemikalije, *Mucor indicus* DSM 2185, povećanje mjerila, izolacija proizvoda bioprocasa, ekstrakcija tekuće-tekuće

EXTENDED ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A BIO-REFINERY SYSTEM FOR BIOFUELS AND BIOCHEMICALS PRODUCTION FROM WASTE LIGNOCELLULOSE CONTAINING FEEDSTOCKS

Biorefineries are processing plants that turn renewable biomass into various chemicals and materials, fuels, and energy. The goal of the biorefinery is to use all the synergies for a sustainable and efficient production, to maximize or optimize the economic, environmental, and social benefits. Depending on the raw materials, technological processes and obtained products, biorefinery systems can be divided into several groups, such as systems based on carbohydrates (biochemical), thermochemical (synthetic gas), and systems based on biogas or carbon-rich products (biodiesel) (Farzad et al., 2017). Biochemical systems are focused on the bioconversion of sugars derived from lignocellulosic and other raw materials (Puri et al., 2013; Isikgor and Becer, 2015; Takkellapati et al., 2018). This research has developed a new biorefinery system to produce biofuels and biochemicals from waste lignocellulosic raw materials.

The goals of this thesis were:

1. To determine the influence of enzyme preparations and/or enzymes of working microorganisms for the production of biofuels and biochemicals on the efficiency of enzymatic hydrolysis of pre-treated lignocellulosic raw materials,
2. To determine the optimal conditions for the management of the bioprocesses, i.e. the process of separation and purification of the products of these bioprocesses within the biorefinery system,
3. Determination of the biorefinery system efficiency for the production of biofuels and biochemicals from waste lignocellulosic raw materials

RESEARCH METHODOLOGY

The research methodology of this thesis consisted of:

1. Preparation of waste lignocellulosic raw materials (wheat straw, waste grass, corn stover, corn cobs) by mechanical shredding to the optimal particle size for the implementation of physio-chemical acid pre-treatment in a high-pressure reactor. The composition of waste lignocellulosic raw materials used in the work was determined by using standard NREL methods (Sluiter et al., 2012).
2. The pretreatment process involved the application of 0,5% dilute sulphuric acid at different temperatures (160 - 200°C) and retention times (1 - 10 min). The optimal pre-treatment conditions for lignocellulosic feedstock in such a system were determined: (i) in regard to the maximum sugar concentration and the minimum concentration of inhibitors present in the liquid phase of the hydrolyzate; (ii) with regard to the composition of the solid phase after the pre-treatment process, i.e. the highest possible content of cellulose in the solid phase. Concentration of sugars (glucose, xylose, arabinose, mannose, galactose) and potential inhibitors of enzymatic reactions and/or working microorganisms (eg furfural, 5-hydroxymethylfurfural, acetic acid, levulinic acid, formic acid and degradation products) were determined by spectrophotometric and chromatographic (UPLC) methods optimized for the analysis of the liquid and solid phase samples obtained after dilute acid pretreatment of lignocellulosic feedstock in a high pressure reactor.
3. Enzymatic hydrolysis of the solid phase of the lignocellulosic feedstock after processing with dilute acids was optimized by using commercial enzyme preparations Cellulase, enzyme blend and Viscozyme L and/or microorganisms with relatively high lignocellulolytic activity. Studies with commercially available enzyme preparations were performed with different initial amounts of added enzyme and substrate concentrations, at different temperatures and hydrolysis times to determine the optimal conditions for enzymatic hydrolysis of the solid phase lignocellulosic feedstock obtained after dilute acid pretreatment. The yield of total fermentable sugars (glucose and xylose) after hydrolysis was used as the main criterion for the success of enzymatic hydrolysis. The most successful pretreatment process was applied in further research on enzymatic hydrolysis and biofuel production on a larger scale. In parallel with this research, selected microorganisms (*Mucor indicus* DSM 2185, *Paecilomyces variotii* CBS 372.70, *Myceliophthora thermophila* CBS 663.74, *Thielavia terrestris* CBS 456.75, *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium*

oxysporum f.sp. langenariae JCM 9293, and *Fusarium verticillioides* JCM 23107) were grown in Erlenmeyer flasks using nutrient media of different compositions supplemented with the solid phase as the inducer of enzyme production by sequential solid-state and submerged cultivation. After the isolation of the supernatants, the characterization of enzyme extracts was performed and lignocellulolytic activity was determined. Enzyme characterization was performed based on the protein profile using denaturing discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

4. After the optimization of the hydrolysis process of lignocellulosic raw materials, the fermentation ability of selected working microorganisms (*Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor indicus*) for bioethanol production was examined. Fermentations were carried out on both (solid and liquid) phases of lignocellulosic hydrolyzates. Bioprocesses were scaled up to a larger scale, and different types of bioreactors were used to carry out the process (stirred tank bioreactor, horizontal rotating tubular bioreactor, and bubbling column). Bioethanol production was optimized to achieve its maximum yield with minimum energy consumption. In order to meet the set criteria, the integration of production with the system for direct extraction of ethanol from the fermentation broth by extraction with higher alcohols was carried out. Bearing in mind the zero waste concept and dimorphism of *Mucor indicus*, the possibility of directing the bioprocess towards the desired product was investigated in detail, i.e. the possibility of producing microbial lipids using was investigated. Isolation and purification of microbial lipids from the biomass of the working microorganism was based on extraction with a mixture of organic solvents (methanol and chloroform), and isolation and purification of the polyunsaturated fatty acids by reactive extraction method in combination with other methods was performed. Gravimetric (dry matter of biomass), extraction (total lipids) and spectrophotometric methods (concentration of proteins, pigments, optical density of samples), liquid chromatography methods (UPLC method for determination of carbohydrates, fermentation inhibitors and products such as ethanol, sugar alcohols, organic acids) and gas chromatography (fatty acid composition of microbial lipids by GC-FID method) were used to monitor the bioprocess performance.
5. Based on the obtained results, the optimal configuration of the biorefinery system for the production of ethanol and biochemicals was formed with the application of the zero-waste concept, and adherence to the criteria of ecological and economic sustainability of the formed biorefinery system.

RESULTS; DISCUSION AND CONCLUSIONS

After dilute acid pretreatment of wheat straw, waste grass, corn stover and corn cobs in a high-pressure reactor, at a temperature of 180°C, retention time (t_z) of 1, 5 and 10 min using 0,5% sulfuric acid, two phases were obtained: solid (pre-treated raw material) and liquid phase. The highest total mass of sugars in the liquid phase of 148,1 g was obtained after pretreatment of corn cobs at $t_z = 10$ min, while at other t_z of 1 min and 5 min slightly lower masses of 100.67 g and 115.42 g were obtained. waste grass yielded masses of total carbohydrates of 123.5 g, 106 g and 112.2 g. By treating wheat straw using these conditions the total mass of sugars ranged from 62.69 g to 110.89 g, and by pretreatment of corn stover the mass of all sugars present in the liquid phase was in the range of 87.46 g to 121.67 g. Increasing the retention time and temperature lead to an increase in the mass of total sugars. All acid hydrolysates were mostly composed of xylan, followed by arabinan, while the glucan content was the lowest. Considering the results of pre-treatment at 180°C, a further increase or decrease in the retention time and temperature lead to a decrease in the total mass of sugars. By increasing the temperature and retention times an increase in inhibitor concentrations was observed. Maximum concentrations of furans were recorded at a reaction temperature of 200°, and depending on the raw material, ranged from 469.21 mg L⁻¹ to 1684.45 mg L⁻¹. At the same temperature, the highest concentrations of acetic and formic acid were recorded, between 0.59 g L⁻¹ and 4.69 g L⁻¹ of acetic acid and 0.79 g L⁻¹ to 1,86 g L⁻¹ of formic acid. Under the influence of high pretreatment temperature of 200°C, levulinic acid in the range of 0.04 g L⁻¹ to 0.40 g L⁻¹ was also detected.

Using composition analysis of all solid phases obtained after dilute acid pretreatment of lignocellulosic raw materials, pretreated corn cobs obtained after pretreatment at 180 ° C and t_z of 10 min (low xylan content; $w_{\text{xyl}} = 1.1\% \pm 0.07\%$ and high glucan content; $w_{\text{glc}} = 55.58\% \pm 3.48\%$) were selected as the raw material in all enzymatic hydrolysis experiments. The enzymatic hydrolysis of the pre-treated corn cobs at 50°C, pH 5.0 using Viscozyme L and Cellulase, enzyme blend, showed that Viscozyme L has higher hemicellulolytic activity, while Cellulase, enzyme blend had higher cellulolytic activity. Based on the conducted hydrolysis of 40 g L⁻¹ of pretreated corn cobs, the highest yield of 84.88% of total carbohydrates was obtained using a combination of 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend and 5% vol vol⁻¹ Viscozyme L. Using DesignExpert it was calculated that to achieve the maximum degree of hydrolysis of total carbohydrates of 92.66%; 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend and 5.18% vol vol⁻¹ Viscozyme L was needed. By performing enzymatic hydrolysis of pretreated corn cobs with a

combination of 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend and 5.18% vol vol⁻¹ Viscozyme L at temperatures of 20 ° C, 30 ° C and 40 ° C, in acetate buffer and matrix medium, the maximum degree of total sugar hydrolysis of 100% was obtained using the matrix medium at a temperature of 40°C, while at the same temperature the degree of hydrolysis in the acetate buffer was 62.68%. Further lowering of the temperatures leads to a significant decrease in enzyme activity and thus to a lower hydrolysis degree of total sugars.

Because of the relatively high cost of enzyme mixtures, seven fungal species (*Mucor indicus* DSM 2185, *Paecilomyces variotii* CBS 372.70, *Myceliophthora thermophila* CBS 663.74, *Thielavia terrestris* CBS 456.75, *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738, *Fusarium oxysporum* f.sp . *langenariae* JCM 9293, and *Fusarium verticillioides* JCM 23107) and four nutrient media were used in the screening for effective lignocellulose degrading enzymes. From the seven tested fungi, *F. oxysporum* and *F. verticillioides*, along with nutrient medium 4, were selected as the best medium and producers of lignocellulolytic enzymes based on the determined xylanase (>4 U mg⁻¹) and glucanase activity (≈2 U mg⁻¹). Nutrient medium 4 supplemented with pretreated corn cobs was used in the production of lignocellulolytic enzymes by sequential solid-state and submerged cultivation of *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, and a mixed culture of both strains. *F. oxysporum* showed 6 times higher exoglucanase activity (3.33 U mg⁻¹) after 5 days of cultivation in comparison with *F. verticillioides* (0.55 U mg⁻¹). *F. oxysporum* also showed 2 times more endoglucanase activity (0.33 U mg⁻¹). The mixed culture cultivation showed similar endo- and exoglucanase activities compared to *F. oxysporum* (0.35 U mg⁻¹; 7.84 U mg⁻¹). Maximum xylanase activity was achieved after 7 days of cultivation of *F. verticillioides* (≈16 U mg⁻¹), while *F. oxysporum* showed maximum activity after 9 days that was around 2 times lower compared to that of *F. verticillioides*. The mixed culture achieved maximum xylanase activity after only 4 days, but the specific activity was similar to activities observed for *F. oxysporum*. It can be concluded that both fungal strains can be used as producers of enzyme cocktails for the degradation of lignocellulose containing raw materials, and that corn cobs can be used as an inducer for enzyme production.

After the pre-treatment process, preliminary experiments were carried out to select the working microorganism. The yeast *S. cerevisiae* Y9 and mold *M. indicus* DSM 2185 were firstly grown under aerobic and aerobic conditions using glucose, xylose and a mixture of these two sugars as the carbon sources. The mold *M. indicus* showed higher ethanol yields in almost all experiments ($Y_{\text{etoh/s}}=0,11-0,42 \text{ g g}^{-1}$), and it could metabolise xylose as the sole carbon source while the yeast consumed glucose and xylose simultaneously but couldn't use xylose as

the sole carbon source. Further optimizations were carried out regarding the nitrogen source. The mold *M. indicus* DSM 2185 cannot grow in a medium with glucose supplemented with 1 - 10 g L⁻¹ of diammonium sulphate or diammonium phosphate as the nitrogen source. The mold grew in media to which peptone, meat extract, yeast extract or corn steep liquor (CSL) were added. The highest product yields were achieved in the medium to which CSL was added as a nitrogen source, in particular when the media contained 5 g L⁻¹ or 7 g L⁻¹ of CSL. In addition *M. indicus* DSM 2185 was grown on non-detoxified and detoxified dilute acid hydrolyzates of pretreated corn cobs to which yeast extract and CSL were added as nitrogen sources. The maximum yield of ethanol (≈ 5.5 g L⁻¹) was obtained after cultivation in undetoxified hydrolyzate with the addition of 5 g L⁻¹ and 10 g L⁻¹ CSL, respectively, while cultivation on detoxified hydrolyzate obtained slightly lower yields of ethanol (≈ 4.5 g L⁻¹), but higher yields of xylitol (≈ 2.0 g L⁻¹). It has also been observed that the mold can use acetic acid as a carbon source. After these cultivations the fatty acid content in the *M. indicus* biomass was determined. The content of fatty acids in biomass after cultivation on non-detoxified hydrolyzate ranged from 31.11% to 39.17%, and after cultivation on detoxified hydrolyzate the content was between 30.25% and 40.25%. A total of 22 fatty acids were detected, of which oleic, linoleic, palmitic, and linoleic acids were the most abundant. Using a control media and two liquid residues of media obtained after the cultivations of *M. indicus*, the purple non-sulfur bacteria *R. adriaticum* DSM 2781 was successfully cultivated, and produced between 0.37 g L⁻¹ and 0.798 g L⁻¹ biomass; 3.70 to 60.12 mg g⁻¹ total pigments, and 1.02 g of L⁻¹ of isopropanol was detected after cultivations on liquid residues of media previously containing CSL.

Simultaneous saccharification and fermentation was also carried out, to further decrease bioprocess costs. The experiments used *M. indicus* DSM 2185 with the addition of 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend and 5.18% vol vol⁻¹ Viscozyme L in Erlenmayer flasks. The most successful bioprocess contained pre-treated corn cobs and CSL (matrix media) at 30 ° C in which an ethanol productivity of 0.312 g L⁻¹ h⁻¹ was achieved, while when the cultivations were carried out in acetate buffer an ethanol productivity of 0.304 g L⁻¹ h⁻¹ was attained. Lowering and raising the bioprocess temperature leads to a significant reduction in the productivity of the ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation.

A scale up of the ethanol production process using dilute acid and enzymatic hydrolyses of corn cobs was carried out using different bioreactor systems. Bioprocess productivity of 0.143 g L⁻¹ h⁻¹ of ethanol, 0.168 g L⁻¹ h⁻¹ of xylitol and 0.008 g L⁻¹ h⁻¹ glycerol was achieved during the cultivation of *M. indicus* DSM 2185 in a stirred tank bioreactor by

using the dilute acid hydrolysates of corn cobs. Cultivations in the bubbling column yielded $0.052 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of ethanol, $0.008 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of xylitol and $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of glycerol, while cultivation in the horizontal rotating tubular bioreactor (HRTB) yielded $0.029 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of ethanol, $0.013 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of xylitol and $0.003 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of glycerol. The maximum biomass yield of 7.51 g L^{-1} was obtained in the bubbling column, while the lowest biomass yield of 3.32 g L^{-1} was obtained in the HRTB. An ethanol productivity of $0.222 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $0.006 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ glycerol was achieved during the cultivation of *M. indicus* DSM 2185 in a stirred tank bioreactor on the enzymatic hydrolyzate of pre-treated corn cobs. Cultivations in the bubbling column yielded $0.270 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ethanol and $0.028 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ glycerol, while cultivation in the HRTB yielded $0.110 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ethanol, $0.001 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ xylitol and $0.007 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ glycerol. The maximum biomass yield of 7.99 g L^{-1} was obtained in the bubbling column, while the lowest biomass yield of 3.83 g L^{-1} was obtained in the HRTB. Usage of liquid residue of media obtained after the cultivation of *M. indicus*, for the cultivation of purple non-sulphur bacterium *R. adriaticum* DSM 2781, was successfully done in a stirred tank bioreactor, and 2.26 g L^{-1} of biomass and 14.62 mg g^{-1} of total pigments were produced. The bacterium also produced acetic acid and isopropanol with yields of $0.034 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $0.065 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively.

The process of simultaneous saccharification and fermentation was also scaled up, and the mold *M. indicus* DSM 2185 was grown in a stirred tank bioreactor on a substrate containing pretreated corn cobs, CSL, at a temperature of 30°C and with the addition of 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend and 5.18% vol vol⁻¹ Viscozyme. The achieved ethanol productivity was $0.004 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, while shortening the duration of the process to 22 h the ethanol productivity would be $0.75 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

The extraction and purification of some fermentation products was also carried out. For the extraction of ethanol; pentan-1-ol, octan-1-ol, nonan-1-ol and oleyl alcohol were used. They showed that in a mixture with ethanol and water they were able to separate into two phases, extract and raffinate which makes them suitable for ethanol extraction from fermented media. In batch extraction of ethanol three extraction steps would be required for pentan-1-ol (efficiency of 75.21%), for nonan-1-ol eight degrees of extraction (efficiency of 30.81%), and for oleyl alcohol one degree (efficiency of 3.11%). Continuous extraction of ethanol could be carried out with all investigated solvents in order to obtain 0.04 kg kg^{-1} of ethanol in the raffinate. For a substrate inlet flow of 1000 kg h^{-1} with a concentration of 0.063 kg kg^{-1} ethanol, a minimum solvent flow of 450 kg h^{-1} would be required for pentan-1-ol, 824 kg h^{-1} for octan-1-ol, 1000 kg h^{-1} for nonan-1-ol, and 2655 kg h^{-1} for oleyl alcohol.

Ethanol, acetone, and isopropanol were used to separate xylitol by crystallization from an aqueous solution, and from the dilute acid corn cob hydrolyzate. The highest yield of the xylitol crystallization process from aqueous solution was achieved with the use of acetone (30.95%), while the highest yield of 17.87% was achieved when ethanol was used to crystallize xylitol from the corn cob hydrolyzate.

By isolating a significant amount of biomass after cultivations in different bioreactor systems, *M. indicus* DSM 2185 biomass can serve as a good source for the isolation of by-products such as chitin and chitosan. Yields of isolated chitin and chitosan from *M. indicus* DSM 2185 grown on dilute acid corn cob hydrolyzate vary between 0.14 g g⁻¹ and 0.30 g g⁻¹ chitin and 0.08 to 0.16 g g⁻¹ chitosan, while the yields of chitin and chitosan isolated from biomass obtained after cultivation on the enzymatic hydrolyzate of pretreated corn cobs varied between 0.15 g g⁻¹ to 0.22 g g⁻¹ of chitin and 0.07 g g⁻¹ to 0.12 g g⁻¹ of chitosan.

Key words: biorefinery, pre-treatment of lignocellulosic biomass, lignocellulolytic enzyme production, bioethanol, biochemicals, *Mucor indicus*, scale-up, bioprocess products isolation, liquid-liquid extraction

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Biorafinerije	3
2.1.1. Proizvodi biorafinerija	5
2.1.1.1. Biogoriva prve generacije	6
2.1.1.2. Biogoriva druge generacije	7
2.1.1.3. Biogoriva treće generacije	7
2.2. Lignocelulozne sirovine	8
2.2.1. Sastav i struktura lignoceluloznih sirovina	8
2.2.1.1. Celuloza	9
2.2.1.2. Hemiceluloza	9
2.2.1.3. Lignin	10
2.2.2. Obrada lignoceluloznih sirovina	11
2.2.2.1. Fizikalne metode predobrade	11
2.2.2.2. Fizikalno-kemijske metode predobrade	11
2.2.2.3. Biološke metode predobrade	12
2.2.2.3.1. Celulaze	13
2.2.2.3.2. Ksilanaze	14
2.2.2.3.3. Lignin degradirajući enzimi	15
2.2.2.3.4. Komercijalni enzimi za enzimsku hidrolizu lignoceluloznih sirovina	15
2.2.2.4. Kemijske metode predobrade	15
2.2.2.4.1. Predobrada kiselinama	16
2.2.2.4.2. Predobrada lužinama	17
2.2.2.4.3. Organosolv postupak	18
2.2.2.5. Ostale metode predobrade	19
2.2.3. Inhibitori koji nastaju tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina	20
2.3. Proizvodnja biokemikalija i biogoriva iz lignoceluloznih sirovina	22
2.3.1. Bioetanol	22
2.3.1.1. Tehnike vođenja procesa proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina	24
2.3.2. Ksilitol	27
2.3.2.1. Proizvodnja ksilitola	27
2.3.3. Hitin i hitozan	29
2.4. Potencijalni mikroorganizmi za proizvodnju biogoriva i biokemikalija u biorafinerijskom sustavu iz lignoceluloznih sirovina	33
2.4.1. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.4.2. Plijesan <i>Mucor indicus</i>	34

2.4.2.1.	Sastav stanične stijenke <i>Mucor indicus</i> -----	35
2.4.2.2.	Proizvodnja etanola pomoću plijesni <i>Mucor indicus</i> -----	36
2.4.2.3.	Proizvodnja masnih kiselina pomoću plijesni <i>Mucor indicus</i> -----	37
2.4.2.4.	Obrada otpadnih voda pomoću plijesni <i>Mucor indicus</i> -----	38
2.4.3.	Ljubičaste nesumporne bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i>	38
3.	MATERIJALI I METODE	41
3.1.	Materijali.....	41
3.1.1.	Radni mikroorganizmi za proizvodnju biogoriva i biokemikalija u biorafinerijskom sustavu iz otpadnih lignoceluloznih sirovina.....	41
3.1.2.	Sirovine, kemikalije i enzimi korišteni u istraživanju.....	41
3.1.3.	Hranjive podloge.....	45
3.1.3.1.	Hranjive podloge za održavanje radnih mikroorganizama -----	45
3.1.3.2.	Hranjive podloge za uzgoj inokuluma plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 i kvasca <i>S. cerevisiae</i> Y9 -----	45
3.1.3.3.	Hranjive podloge korištene u istraživanju lignocelulolitičke aktivnosti plijesni -----	45
3.1.3.4.	Hranjive podloge za uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> Y9 i plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u svrhu optimizacije procesa proizvodnje biogoriva i biokemikalija-----	46
3.1.3.5.	Hranjive podloge za uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 s različitim izvorima dušika-----	47
3.1.3.6.	Hranjive podloge za uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na blago kiselom hidrolizatu kukuruznih oklasaka (BKHKO) i različitim izvorima dušika-----	47
3.1.3.7.	Tekući ostatak hranjive podloge (TOHP) za uzgoj bakterije <i>R. adriaticum</i> DSM 2781 -----	47
3.1.3.8.	Hranjiva podloga za uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u Erlenmeyerovim tikvicama i u bioreaktoru s mješalom tehnikom simultane enzimske saharifikacije i fermentacije-----	47
3.1.3.9.	Hranjive podloge za uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u većem mjerilu korištenjem različitih tipova bioreaktora -----	48
3.1.4.	Aparatura i pribor.....	49
3.1.4.1.	Mlin čekićar -----	49
3.1.4.2.	Visokotlačni reaktor za termičku obradu lignoceluloznih sirovina ----	49
3.1.4.3.	Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC) -----	50
3.1.4.4.	Uređaj za plinsku kromatografiju (GC) -----	50
3.1.4.5.	Spektrofotometri-----	51
3.1.4.6.	Centrifuge -----	51
3.1.4.7.	Bioreaktor s mješalom -----	51
3.1.4.8.	Barbotirajuća kolona-----	51
3.1.4.9.	Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)-----	52
3.1.4.10.	Oprema za istraživanje kontinuirane ekstrakcije -----	53
3.1.4.11.	Ostala korištena oprema -----	54
3.1.4.12.	Programski paketi -----	54
3.2.	Metode.....	55

3.2.1. Fizikalno-kemijska predobrada lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom	55
3.2.1.1. Analiza sastava lignoceluloznih sirovina	55
3.2.1.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina	55
3.2.1.3. Dvostupanjska kiselinska hidroliza	55
3.2.1.4. Određivanje udjela netopivog lignina	56
3.2.1.5. Određivanje udjela topivog lignina	56
3.2.1.6. Određivanje ukupnih furana	56
3.2.2. Biološki postupak obrade predobrađenih otpadnih lignoceluloznih sirovina	57
3.2.2.1. Enzimaska hidroliza kukuruznih oklasaka pomoću komercijalnih enzima	57
3.2.2.2. Enzimaska hidroliza kukuruznih oklasaka pomoću komercijalnih enzima pri različitim temperaturama	58
3.2.2.3. Priprema acetatnog pufera	59
3.2.2.4. Priprema matrične hranjive podloge (MHP)	59
3.2.3. Uzgoj odabranih vrsta plijesni za procjenu lignocelulolitičke aktivnosti i proizvodnju lignocelulolitičkih enzima	59
3.2.3.1. Kultivacija predkultura za indukciju proizvodnje lignocelulolitičkih enzima	59
3.2.3.2. Kombinirana redosljedna fermentacija čvrstog supstrata i submerzna fermentacija u svrhu proizvodnje lignocelulolitičkih enzima	60
3.2.3.3. Pročišćavanje proteina	60
3.2.4. Uzgoj odabranih vrsta mikroorganizama (kvasca <i>S. cerevisiae</i> Y9, plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 i bakterije <i>R. adriaticum</i> DSM 2781) u svrhu optimizacije proizvodnje biogoriva i biokemikalija	61
3.2.4.1. Uzgoj inokuluma kvasca <i>S. cerevisiae</i> Y9 i plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185	61
3.2.4.2. Uzgoj inokuluma bakterije <i>R. adriaticum</i> DSM 2781	61
3.2.4.3. Uzgoj kvasca <i>S. cerevisiae</i> Y9 i plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u svrhu optimizacije proizvodnje biogoriva i biokemikalija	61
3.2.4.4. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na podlogama s različitim izvorima dušika te glukozom kao izvorom ugljika u aerobnim uvjetima	62
3.2.4.5. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na hidrolizatu kukuruznih oklasaka i različitim izvorima dušika	62
3.2.4.6. Uzgoj bakterije <i>R. adriaticum</i> DSM 2781 na TOHP dobivenim nakon uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na sirovom blago kiselom hidrolizatu kukuruznih oklasaka (SBKHKO) i dekoloriziranom blago kiselom hidrolizatu kukuruznih oklasaka (DBKHKO)	63
3.2.4.7. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 simultanom saharifikacijom i fermentacijom na PKO	63
3.2.5. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u većem mjerilu korištenjem različitih izvedbi bioreaktora	63
3.2.5.1. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom	63
3.2.5.2. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u barbotirajućoj koloni	64

3.2.5.3.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru -----	64
3.2.5.4.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 tijekom simultane saharifikacije i fermentacije u bioreaktoru s miješalom -----	65
3.2.5.5.	Uzgoj bakterije <i>R. adriaticum</i> DSM 2781 na TOHP dobivenoj nakon uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom -----	65
3.2.6.	Izdvajanje i pročišćavanje biokemikalija dobivenih tijekom bioprocasa uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u različitim bioreaktorskim sustavima na podlogama dobivenim fizikalno-kemijskim i biološkim procesima obrade lignoceluloznih sirovina	66
3.2.6.1.	Preliminarno istraživanje ponašanja trokomponentnih smjesa i izrada trokutnih trokomponentnih dijagrama-----	66
3.2.6.2.	Ravnotežne koncentracije, razdjeljivanje faza i izrada binodalnih krivulja za trokomponentne smjese-----	66
3.2.6.3.	Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze u prisutnosti komponenata fermentirane hranjive podloge-----	67
3.2.6.4.	Istraživanje ekstraktivnih svojstava ekstraktanata u kontinuiranom sustavu za ekstrakciju-----	67
3.2.6.5.	Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije etanola -----	68
3.2.6.6.	Izdvajanje ksilitola -----	70
3.2.6.7.	Izdvajanje hitina i hitozana iz biomase plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 -- -----	71
3.3.	Analitičke metode	72
3.3.1.	Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti (UPLC)	72
3.3.2.	Određivanje celulolitičke i hemicelulolitičke aktivnosti.....	72
3.3.3.	Određivanje lakazne aktivnosti	73
3.3.4.	Određivanje lignin peroksidazne aktivnosti	73
3.3.5.	Određivanje celobioza dehidrogenazne aktivnosti.....	73
3.3.6.	Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Bradfordu.....	73
3.3.7.	SDS elektroforeza	74
3.3.8.	Identifikacija peptida LC-ESI-MS sustavom	74
3.3.9.	Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase mikroorganizama na kraju uzgoja	75
3.3.10.	Određivanje koncentracije i sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskom detekcijom.....	75
3.3.11.	Određivanje optičke gustoće hranjive podloge	77
3.3.12.	Ekstrakcija ukupnih pigmenata i spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila <i>a</i>	77
3.3.13.	Analiza uzoraka izdvajanja etanola plinskom kromatografijom s plameno-i onizacijskom detekcijom.....	78

3.3.14. Pokazatelji uspješnosti bioprocesa	79
4. REZULTATI	80
4.1. Fizikalno-kemijska i biološka predobrada te priprema otpadnih lignoceluloznih sirovina za proizvodnju specifičnih biokemikalija i biogoriva u biorafinerijskom sustavu.....	83
4.1.1. Fizikalno-kemijska predobrada otpadnih lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature.....	83
4.1.1.1. Fizikalno-kemijska predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature--	84
4.1.1.2. Fizikalno-kemijska predobrada otpadne trave u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature-----	87
4.1.1.3. Fizikalno-kemijska predobrada kukuruzovine u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature-----	90
4.1.1.4. Fizikalno-kemijska predobrada kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature--	93
4.1.2. Procjena uspješnosti i optimizacija bioloških postupaka obrade predobrađenih otpadnih lignoceluloznih sirovina pomoću odabranih komercijalnih enzimskih pripravaka.....	96
4.1.3. Rezultati istraživanja uzgoja odabranih vrsta plijesni za procjenu lignocelulolitičke aktivnosti i proizvodnju lignocelulolitičkih enzima.....	101
4.1.3.1. Kombinirana redosljedna fermentacija čvrstog supstrata i submerzna fermentacija u svrhu proizvodnje lignocelulolitičkih enzima te njihova karakterizacija -----	103
4.2. Optimizacija uzgoja odabranih vrsta mikroorganizama (kvasca <i>S. cerevisiae</i> Y9, plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 i bakterije <i>R. adriaticum</i> DSM 2781) za proizvodnju biogoriva i biokemikalija.....	106
4.2.1. Rezultati uzgoja kvasca <i>S. cerevisiae</i> Y9 i plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u svrhu optimizacije procesa proizvodnje biogoriva i biokemikalija	107
4.2.2. Optimizacija uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na podlogama s različitim izvorima dušika te glukozom kao izvorom ugljika u aerobnim uvjetima.....	110
4.2.3. Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na predbrađenom hidrolizatu kukuruznih oklasaka i različitim izvorima dušika.....	112
4.2.3.1. Utjecaj izvora dušika na profil masnih kiselina u biomasi plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 kultiviranoj na glukozu i različitim izvorima dušika	117

4.2.3.2.	Utjecaj različitih izvora dušika na profil masnih kiselina u biomasi plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 kultiviranoj na BKHKO i DBKHKO	119
4.2.4.	Rezultati uzgoja bakterije <i>R. adriaticum</i> DSM 2781 na TOHP dobivenim nakon uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na kiselinskom hidrolizatu i dekoloriziranom kiselinskom hidrolizatu.....	121
4.2.5.	Rezultati simultane saharifikacije i fermentacije PKO pomoću plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185.....	122
4.3.	Rezultati optimizacije proizvodnje biogoriva i biokemikalija pomoću plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 provedeni u različitim tipovima bioreaktora.....	125
4.3.1.	Rezultati uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom.	126
4.3.1.1.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na BKHKO u bioreaktoru s miješalom-----	126
4.3.1.2.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na E-PKO u bioreaktoru s miješalom-----	127
4.3.2.	Rezultati uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u barbotirajućoj koloni.....	128
4.3.2.1.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na BKHKO u barbotirajućoj koloni -----	128
4.3.2.2.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na E-PKO u barbotirajućoj koloni -----	129
4.3.3.	Rezultati uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru (HRCB).....	130
4.3.3.1.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na BKHKO u HRCB-u-----	130
4.3.3.2.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u HRCB-u na E-PKO -----	131
4.3.4.	Usporedba kinetičkih i pokazatelja uspješnosti bioprocesa u različitim bioreaktorima tijekom uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185	132
4.3.5.	Rezultati uzgoja bakterije <i>R. adriaticum</i> DSM 2781 na TOHP dobivene nakon uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom u mikroaerofilnim uvjetima uz izvor svjetla	134
4.3.6.	Rezultati uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 tijekom simultane saharifikacije i fermentacije u bioreaktoru s miješalom	136
4.4.	Rezultati izdvajanja i pročišćavanja biokemikalija dobivenih tijekom uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u različitim bioreaktorskim sustavima na podlogama dobivenim fizikalno-kemijskim i biološkim procesima obrade lignoceluloznih sirovina.....	137
4.4.1.	Ekstrakcija etanola višim alkoholima	137
4.4.1.1.	Izbor pogodnog organskog otapala za izdvajanje etanola -----	137
4.4.1.1.1.	Preliminarno istraživanje ponašanja trokomponentnih smjesa i izrada trokutnih trokomponentnih dijagrama.....	137

4.4.1.1.2.	Ravnotežne koncentracije, razdjeljivanje faza i izrada binodalnih krivulja za trokomponentne smjese	140
4.4.1.2.	Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze u prisutnosti komponenata fermentirane hranjive podloge-----	143
4.4.1.3.	Istraživanje ekstraktivnih svojstava ekstraktanata u kontinuiranom sustavu za ekstrakciju-----	144
4.4.1.4.	Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije etanola -----	145
4.4.1.4.1.	Izračun broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije za šaržnu ekstrakciju	145
4.4.1.4.2.	Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije za kontinuiranu ekstrakciju	147
4.4.2.	Izdvajanje ksilitola	148
4.4.3.	Izdvajanje hitina i hitozana iz biomase plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185	149
4.5.	Bilance mase i proizvoda u integriranom biorafinerijskom sustavu proizvodnje biokemikalija i biogoriva iz lignocelulozne sirovine.....	150
5.	RASPRAVA	150
5.1.	Fizikalno-kemijska i biološka obrada te priprema otpadnih lignoceluloznih sirovina za proizvodnju specifičnih biokemikalija i biogoriva primjenjujući biorafinerijski pristup.....	150
5.1.1.	Fizikalno kemijska predobrada otpadnih lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature.....	150
5.1.1.1.	Fizikalno-kemijska predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature-- -----	151
5.1.1.2.	Fizikalno-kemijska predobrada otpadne trave u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature-----	154
5.1.1.3.	Fizikalno-kemijska predobrada kukuruzovine u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature-----	156
5.1.1.4.	Fizikalno-kemijska predobrada kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature-- -----	159
5.1.2.	Procjena uspješnosti i optimizacija bioloških postupaka obrade predobrađenih kukuruznih oklasaka pomoću odabranih komercijalnih enzimskih pripravaka	163
5.1.3.	Rezultati istraživanja uzgoja odabranih vrsta plijesni za procjenu lignocelulolitičke aktivnosti i proizvodnju lignocelulolitičkih enzima.....	172
5.1.3.1.	Kombinirana redosljedna fermentacija čvrstog supstrata i submerzna fermentacija u svrhu proizvodnje lignocelulolitičkih enzima te njihova karakterizacija -----	176

5.2.	Uzgoj odabranih vrsta mikroorganizama (kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y9, plijesni <i>Mucor indicus</i> DSM 2185 i bakterije <i>Rhodovulum adriaticum</i> DSM 2781) zbog optimizacije procesa proizvodnje biogoriva i biokemikalija.....	179
5.2.1.	Rezultati uzgoja kvasca <i>S. cerevisiae</i> Y9 i plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 zbog optimizacije procesa proizvodnje biogoriva i biokemikalija.....	179
5.2.2.	Optimizacija uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na podlogama s različitim izvorima dušika te glukozom kao izvorom ugljika u aerobnim uvjetima.....	183
5.2.3.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na preobrađenom hidrolizatu kukuruznih oklasaka i različitim izvorima dušika.....	186
5.2.3.1.	Utjecaj izvora dušika na profil masnih kiselina u biomasi plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 uzgajane na glukozu i različitim izvorima dušika	189
5.2.3.2.	Utjecaj različitih izvora dušika na profil masnih kiselina u biomasi plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 uzgajane na SBKHKO i DBKHKO -	190
5.2.4.	Rezultati uzgoja bakterije <i>R. adriaticum</i> DSM 2781 na TOHP dobivenom nakon uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na BKHKO	192
5.2.5.	Rezultati uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 dobiveni simultanom saharifikacijom i fermentacijom na PKO.....	194
5.3.	Rezultati optimizacije proizvodnje biogoriva i biokemikalija tijekom uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 provedeni u različitim tipovima bioreaktora ..	197
5.3.1.	Rezultati uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom.	197
5.3.1.1.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na BKHKO u bioreaktoru s miješalom-----	197
5.3.1.2.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na E-PKO u bioreaktoru s miješalom-----	198
5.3.2.	Rezultati uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u barbotirajućoj koloni.....	199
5.3.2.1.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na BKHKO u barbotirajućoj koloni -----	199
5.3.2.2.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 na E-PKO u barbotirajućoj koloni -----	200
5.3.3.	Rezultati uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u HRCB-u	201
5.3.3.1.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> na BKHKO u HRCB-u-----	201
5.3.3.2.	Uzgoj plijesni <i>M. indicus</i> u HRCB-u na E-PKO-----	201
5.3.4.	Usporedba kinetičkih parametara uspješnosti bioprocasa različitih tipova bioreaktora tijekom uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185	203
5.3.5.	Uzgoj bakterije <i>R. adriaticum</i> DSM 2781 na TOHP dobivenoj nakon uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u mikroaerofilnim uvjetima bioreaktora s miješalom uz izvor svjetla.....	205

5.3.6.	Rezultati uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 tijekom simultane saharifikacije i fermentacije u bioreaktoru s miješalom	207
5.4.	Rezultati izdvajanja i pročišćavanja biokemikalija dobivenih tijekom uzgoja plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185 u različitim bioreaktorskim sustavima.....	209
5.4.1.	Ekstrakcija etanola višim alkoholima	209
5.4.1.1.	Izbor pogodnog organskog otapala za izdvajanje etanola	209
5.4.1.1.1.	Preliminarno istraživanje ponašanja trokomponentnih smjese i izrada trokutnih trokomponentnih dijagrama.....	209
5.4.1.1.2.	Ravnotežne koncentracije, razdvajanje faza i izrada binodalnih krivulja za trokomponentne smjese etanol-voda-organsko otapalo	210
5.4.1.2.	Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze u prisutnosti sastojaka fermentirane hranjive podloge.....	211
5.4.1.3.	Istraživanje ekstraktivnih svojstava ekstraktanata u kontinuiranom sustavu za ekstrakciju.....	211
5.4.1.4.	Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije etanola	212
5.4.1.4.1.	Izračun broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije za šaržnu ekstrakciju	212
5.4.1.4.2.	Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije za kontinuiranu ekstrakciju	212
5.4.2.	Izdvajanje ksilitola	214
5.4.3.	Izdvajanje hitina i hitozana iz biomase plijesni <i>M. indicus</i> DSM 2185	215
5.5.	Materijalne bilance sirovina i proizvoda u integriranom biorafinerijskom sustavu proizvodnje specifičnih biokemikalija i biogoriva iz lignocelulozne sirovine	217
6.	ZAKLJUČCI	221
7.	LITERATURA	226
8.	PRILOZI	251
9.	ŽIVOTOPIS	

7. UVOD

1. UVOD

Veliki dio svjetskih energetske potrebe zadovoljava se preradom fosilnih goriva u rafinerijama. Zbog nesigurnosti u osiguravanju dostupnih količina fosilnih sirovina poput nafte, njihovog negativnog utjecaja na okoliš i rasta cijena fosilnih goriva, potrebno je povećati udio drugih izvora energije, kojima bi se izbjegli negativni aspekti upotrebe fosilnih goriva, te smanjila ovisnost čovječanstva o istima. Uz sunčevu energiju, energiju vjetra te energiju vode, biljna biomasa predstavlja još jedan zanimljiv obnovljivi izvor energije. Zamjena nafte biljnom biomasom kao sirovinom za proizvodnju biogoriva i biokemikalija je pokretačka snaga za razvoj koncepta biorafinerija.

U biorafinerijama se gotovo sve vrste sirovina biološkog podrijetla mogu pretvoriti u vrijedne biokemikalije i biogoriva različitih klasa. Biomasa koja se koristi u biorafinerijama može se podijeliti u četiri veće skupine, a to su „energetski usjevi” (uglavnom su to travaste biljke poput miskantusa, divljeg prosa, bambusa, sirka i dr.), brzorastuće drveće, poljoprivredni usjevi (uljarice i žitarice) te biomasa algi.

Posebno su zanimljive lignocelulozne sirovine zbog velike dostupnosti istih, jer nerijetko takve sirovine predstavljaju otpad drugih industrija, npr. stabljike žitarica nakon žetve iz poljoprivredne proizvodnje ili otpad od siječe šuma. Lignocelulozne sirovine nije moguće mikroorganizmima prevesti u vrijedne proizvode bez prethodne obrade sirovina s ciljem oslobađanja jednostavnih šećera iz kristalične strukture tih sirovina.

Stoga su ciljevi ove disertacije

1. Razvoj novoga biorafinerijskoga sustava za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz otpadnih lignoceluloznih sirovina, koji će se sastojati od predobrade sirovine, enzimske hidrolize celuloze i hemiceluloze do fermentabilnih šećera, biokonverzije (fermentacije) dobivenih šećera s pomoću različitih mikroorganizama (uglavnom kvasaca i plijesni), te izdvajanja i pročišćavanja dobivenih proizvoda.

2. Detaljno utvrđivanje „enzimskog potencijala“ odabranih radnih mikroorganizama, kako bi se dodatno poboljšala efikasnost hidrolize predobrađene lignocelulozne sirovine primjenom komercijalno dostupnih enzimskih pripravaka i enzimskog sustava samih radnih mikroorganizama.

3. Pronalaženje načina za uklanjanje ograničavajućih faktora i određivanje optimalnih procesnih parametara biorafinerijskog sustava uz primjenu koncepta bez otpada (eng. zero „waste concept“), te poštivanje kriterija ekološke i ekonomske održivosti takvog sustava.

2. TEORIJSKI DIO

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biorafinerije

U posljednja 2-3 desetljeća, materijali iz biomase, odnosno poljoprivredni usjevi, proizvodi šumarstva, organske frakcije kućnog i industrijskog otpada te vodena biomasa (tj. alge), privlače sve veći istraživački i komercijalni interes kao obnovljivi izvori goriva i kemikalija visoke dodane vrijednosti. Glavni pokretači za korištenje ovih sirovina iz bioloških izvora su povećana globalna potražnja za energijom i potreba za smanjenjem ovisnosti o proizvodnim sustavima temeljenim na fosilnim gorivima, s obzirom na njihov negativan utjecaj na okoliš. Premda su prednosti korištenja bioloških proizvoda dobro poznate, njihovu proizvodnju i korištenje ometaju visoka dostupnost i niža relativna cijena fosilnih goriva. Napredak u tehnikama organske kemije rezultirao je povećanom proizvodnjom velikih količina niskovrijednih transportnih goriva i kemikalija (Holm-Nielsen i Ehimen, 2014; Bozell, 2008.). Upotreba koncepta biorafinerija predložena je kao način za optimizaciju ukupne tehničke, ekonomske i energetske učinkovitosti različitih biotehnoloških procesa pri čemu se dobiva niz vrijednih proizvoda i energija. Biorafinerije su definirane kao postrojenja koja provode procese konverzije biomase, u kemikalije, biomaterijale i energiju maksimizirajući vrijednost biomase te minimizirajući otpad (Vertès i sur., 2017; Alriols i sur., 2010), tj. kao održiva prerada biomase u spektar proizvoda na biološkoj osnovi (hrana, krmivo, kemikalije, materijali) i bioenergiju (biogoriva, energija i/ili toplina) (IEA Bioenergy, 2020). Budući da biorafinerije koriste biomasu kao sirovinu za dobivanje različitih proizvoda kao u klasičnim rafinerijama, one predstavljaju alternativu naftnim rafinerijama, te se može postići održiva i ekološki prihvatljivija proizvodnja. Korištenje biomase kao sirovine može utjecati na smanjenje utjecaja na okoliš, konkretno, smanjenjem emisije štetnih plinova. Uz to, biorafinerije su namijenjene za postizanje sljedećih ciljeva: djelomična zamjena trenutnih goriva i kemijskih građevnih jedinica, opskrba novim baznim kemikalijama za proizvodnju novih materijala, otvaranje novih radnih mjesta, uključujući aktivaciju ruralnih područja, valorizacija otpada (poljoprivredni, gradski i industrijski otpad) te postizanje smanjenja emisija stakleničkih plinova (Vertès i sur., 2017; Holm-Nielsen i Ehimen, 2014). Glavni razlog poticanja implementacije biorafinerijskih sustava je zamjena industrijskih i energetske fosilnih sirovina, 'zelenim' sirovinama. Proizvodnja energije iz ovih sirovina posebno je favorizirana u odnosu na fosilne sirovine budući da je gotovo neto neutralna emisija ugljičnog dioksida dostižna kada se kod proizvodnje biomase i energije upravlja održivo. Međutim, postizanje takvih ciljeva

„zelene” energije zahtijeva ekonomsku motivaciju za pretvorbu biomaterijala u obnovljiva goriva. Kako su goriva kao proizvodi obično nisko vrijedni bez obzira na primjenjenu biomasu, ovaj se ekonomski poticaj može ostvariti korištenjem biorafinerijskih sustava u kojima se dobivaju proizvodi visoke dodane vrijednosti.

Klasifikacija biorafinerija temelji se na četiri glavne značajke, a to su platforme, proizvodi, sirovine i procesi. Platforme se odnose na ključne međuprodukte koji nastaju tijekom prerade sirovina u konačne proizvode. Najvažniji međuprodukti su bioplina iz anaerobne digestije, sintetski plin iz uplinjavanja, vodik iz reformiranja pare, elektrolize vode i fermentacije, C6-šećeri iz hidrolize saharoze, škroba, celuloze i hemiceluloze, C5-šećeri iz hidrolize hemiceluloze i celuloze te lignin iz prerade lignocelulozne biomase (Vertès i sur., 2017; Holm-Nielsen i Ehimen, 2014; Alriols i sur., 2010). Prema proizvodima, biorafinerije se mogu grupirati u dvije glavne kategorije, energetske i neenergetske. Kod energetskih biorafinerija glavni proizvod je energija, npr. biogoriva, struja i toplina, dok su kod biorafinerija za dobivanje kemikalija glavni proizvod biokemikalije veće dodane vrijednosti. Sirovine korištene u biorafinerijama mogu biti namjenske sirovine (usjevi šećera, škrobni usjevi, usjevi na bazi ulja, trave, morska biomasa) i otpaci (otpaci na bazi ulja, lignocelulozni otpaci, organski otpaci i drugi) (Vertès i sur., 2017). Postupak konverzije biomase u konačni proizvod može biti mehanički/fizikalni proces u kojem je kemijska struktura komponenata biomase očuvana (prešanje, mljevenje, odvajanje, destilaciju itd.), biokemijski proces pri umjerenoj temperaturi i tlaku, uz primjenu mikroorganizama ili enzima, kemijski proces u kojem dolazi do promjene supstrata djelovanjem kemikalija (npr. hidroliza, transesterifikacija, hidrogeniranje, oksidacija), i konačno termokemijski, u kojem na sirovinu djeluju ekstremni uvjeti (visoki tlak i visoka temperatura, sa ili bez katalizatora) (Vertès i sur., 2017; Cherubini i sur., 2009). Obzirom na broj različitih sirovina, proizvodnih procesa i krajnjih proizvoda, biorafinerije se mogu podijeliti na biorafinerije prve, druge i treće faze. Biorafinerije prve faze (eng. „phase I biorefinery“) jednim tehnološkim postupkom, jednu sirovinu pretvaraju u jedan glavni proizvod, kao što su biorafinerije koje kao sirovinu koriste biljno ulje od kojega se transesterifikacijom proizvode biodizel i glicerol kao nusproizvod (Vertès i sur., 2017; Cherubini i sur., 2009). Slične biorafinerijama prve faze su biorafinerije druge faze (eng. „phase II biorefinery“) koje koriste jednu sirovinu, ali su u mogućnosti proizvesti više različitih krajnjih proizvoda. Pokazalo se da ovakve biorafinerije predstavljaju uspješnije investicije koje istovremeno postižu ekonomske i energetske ciljeve (Cherubini i sur., 2009). Nadalje, ovakvim pristupom proizvodnji biogoriva mogla bi se smanjiti cijena biogoriva i do 30% (IEA

Bioenergy, 2020). Biorafinerije treće faze (eng. „phase III biorefinery“) za proizvodnju više različitih proizvoda koriste više vrsta obnovljivih sirovina.

Cilj biorafinerija trebao bi biti postizanje tzv. „zero waste“ proizvodnje odnosno proizvodnje bez otpada na kraju procesa. Treba težiti inovacijama i unaprjeđivanju postojećih tehnologija kako bi se omogućila integrirana proizvodnja što više vrijednih proizvoda uz maksimalno iskorištavanje sirovina koje ulaze u proces proizvodnje s ciljem ostvarivanja održive proizvodnje.

2.1.1. Proizvodi biorafinerija

S obzirom da se u biorafineriji može koristiti velik broj potencijalnih sirovina i mikroorganizama, širok je i spektar proizvoda koji se mogu dobiti. Kao što je već napomenuto biorafinerije se na temelju proizvoda mogu podijeliti u dvije kategorije, energetske i neenergetske (materijalne) (Vertès i sur., 2017; Holm-Nielsen i Ehimen, 2014).

U neenergetske proizvode ubrajaju se razne kemikalije, od finih kemikalija visoke dodane vrijednosti do tzv. „bulk“ kemikalija niže vrijednosti koje se proizvode u velikim količinama te prekursora za proizvodnju kemikalija visoke dodane vrijednosti. Drugi potencijalni proizvodi biorafinerija su organske kiseline (glukarinska kiselina, levulonska kiselina, 2,5-furan dikarboksilna kiselina, akrilna kiselina), polimeri (PHA, PHB, poliuretani, poliamidi i dr.) i smole, biomaterijali (linoleum), razni derivati glicerola iz proizvodnje biodizela (propilen glikol, epiklorohidrin, propilen, metanol), životinjska hrana, gnojiva i slično. Nadalje, u stanicama algi nakon proizvodnje biodizela, može se naći vrijednih proizvoda poput funkcionalnih lipida, antioksidansa, pigmenata, vitamina, fungicida i sterola (IEA Bioenergy, 2020).

Energetski proizvodi su oni iz kojih se može proizvesti električna energija, toplina ili se mogu koristiti kao goriva. To su čvrsta goriva (lignin, ugljen, drveni peleti), tekuća goriva (bioetanol, biodizel) i plinovita goriva (bioplin, sintetski plin, vodik, metan). Bioplin se dobiva anaerobnom digestijom ili fermentacijom organskih sirovina poput životinjskih gnojovki, s pomoću mješovitih kultura mikroorganizama. Krajnji proizvod obično sadrži 45 – 65% metana, 30 – 40% ugljikova dioksida te druge plinove u tragovima. Bioplin može poslužiti kao zamjena za prirodni plin, no zbog visokog sadržaja CO₂ u usporedbi s prirodnim plinom (do 5%), bioplin ima znatno manju energetska vrijednost. Unatoč tome bioplin predstavlja zanimljivu alternativu prirodnome plinu zbog toga što se za proizvodnju koristi biomasa kao obnovljiva sirovina, nastaju manje emisije stakleničkih plinova, postoji mogućnosti lokalne

proizvodnje te potencijalne neovisnosti o svjetskom tržištu nafte i plina i slično (Ruan i sur., 2019). Biovodik je čisti vodik koji se iz biomase može dobiti postupcima biofotolize, fermentacije u mraku ili na svjetlu te mikrobnom elektrolizom. Sve navedene metode dobivanja vodika iz biomase imaju karakteristične poteškoće tijekom proizvodnih procesa, a fermentacija u mraku se pokazala kao za sada najbolji izbor zbog tehničke jednostavnosti, relativno niske potrošnje energije, umjerenih procesnih uvjeta i stabilnosti procesa. Bioetanol je etanol dobiven fermentacijom raznih sirovina s pomoću odgovarajućih mikroorganizama. Koristi se kao transportno gorivo ili kao aditiv gorivima koja se koriste u motorima s unutarnjim izgaranjem. (Karimi i Chisti, 2015). Bioetanol se uglavnom proizvodi iz šećernih i škrobnih sirovina poput šećerne trske i kukuruza (Janda i sur., 2012). Drugo transportno gorivo koje se može supstituirati biološkom alternativom je dizel kojega može zamijeniti biodizel. Biodizel je bezbojna ili blago-žuta tekuća smjesa koju čine metil-esteri dugolančanih masnih kiselina porijeklom iz biljnih ulja, životinjskih masti, otpadnih ulja ili lipida iz biomase algi. Dobiva se transesterifikacijom pomoću alkohola i lužnatog katalizatora. Iako biodizel, u usporedbi s dizelom fosilnog porijekla, ima nižu kaloričnu vrijednost zbog prisutnosti kisika i manje količine ugljika u svom sastavu, on predstavlja bolje gorivo jer se za proizvodnju koriste obnovljive sirovine, izgara potpunije od fosilnog dizela, sigurniji je za rukovanje zbog niže točke paljenja i njegovim se izgaranjem emitiraju manje količine ispušnih plinova te je biorazgradiv (Ruan i sur., 2019).

Biogoriva proizvedena u biorafinerijama imaju prednost nad tradicionalnim gorivima iz fosilnih izvora u vidu dostupnosti i obnovljivosti sirovina za proizvodnju, ali i manjeg ekološkog otiska, jer se izgaranjem biogoriva oslobađa znatno manje stakleničkih plinova koji pridonose globalnom zatopljenju. Biogoriva koja se najčešće koriste su bioetanol kao zamjena za benzin, biodizel kao zamjena za dizel te bioplin za proizvodnju električne energije i topline, a njihova se proizvodnja može podijeliti na nekoliko generacija (Bušić i sur., 2018).

2.1.1.1. Biogoriva prve generacije

Biogoriva prve generacije proizvode se obradom šećernih i škrobnih sirovina poput šećerne trske, šećerne repe i kukuruza kao glavnih sirovina za proizvodnju bioetanola. Osim njih, za proizvodnju biogoriva prve generacije koriste se i pšenica, sirak i manioka. Tehnologija proizvodnje iz sirovina bogatih šećerom se temelji na ekstrakciji jednostavnih šećera iz navedenih sirovina nakon čega dolazi do fermentacije te se u krajnjem koraku provodi destilacija. Škrobne sirovine se prije fermentacije enzimskom hidrolizom prevode u

jednostavnije šećere, što zahtjeva dodatnu energiju i povisuje troškove proizvodnje. Najveći problem proizvodnje biogoriva prve generacije je taj da njihova proizvodnja konkuriра proizvodnji i cijeni hrane. Nadalje, za njihov uzgoj je potrebno osigurati odgovarajuće poljoprivredne površine, vodu, gnojiva i pesticide koji dodatno povisuju troškove i imaju utjecaj na okoliš (Janda i sur., 2012).

2.1.1.2. Biogoriva druge generacije

Biogoriva druge generacije se proizvode iz lignoceluloznih sirovina kao što su ostaci obrađenih prehrambenih proizvoda (stabljike, lišće i ljuske zaostale nakon obrade biljaka, koža i pulpa zaostale nakon prešanja voća), trave, žitarice s malo zrna te otpaci drvne industrije (piljevina) (Janda i sur., 2012). Za razliku od škrobnih i šećernih sirovina, lignocelulozna biomasa ne zahtijeva ekstenzivnu pripremu zemlje za proizvodnju niti ne konkuriра proizvodnji hrane te nije čimbenik u oscilacijama cijena prehrambenih proizvoda na tržištu (Bušić i sur., 2018). Osim toga, takve su sirovine dostupnije i jeftinije od šećernih i škrobnih sirovina (Sindhu i sur., 2016). Uz sve navedene prednosti, glavni je nedostatak proizvodnje biogoriva iz lignoceluloznih sirovina kompleksni sastav same sirovine koji traži bitno zahtjevniju tehnološku obradu. Zbog takve su građe potrebni procesi predobrade, a predobrađena sirovina sadrži različite tvari (inhibitore, šećere koje radni mikroorganizam ne može prevesti u biogoriva) koje negativno utječu na prinos, brzinu i produktivnost bioprocesa (Marđetko i sur., 2018).

2.1.1.3. Biogoriva treće generacije

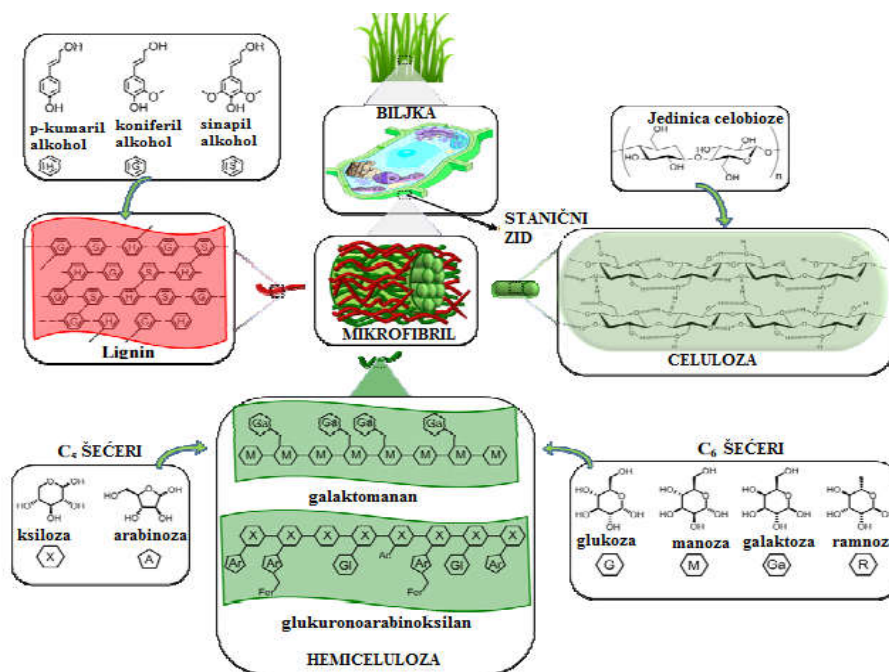
Biogoriva treće generacije proizvode se iz biomase algi. Fotosintetski mikroorganizmi poput mikroalgi za svoj rast i proizvodnju lipida i ugljikohidrata uglavnom zahtijevaju svjetlo, ugljikov dioksid i neke nutrijente (dušik, fosfor i kalij). Korištenjem algi izbjegavaju se navedeni nedostaci prve i druge generacije biogoriva (Behera i sur., 2015).

2.2. Lignocelulozne sirovine

Više od 95% kemikalija koje sadrže ugljik proizvedeno je iz fosilnih izvora (Rass-Hansen i sur., 2007). Umjesto fosilnih izvora kao obećavajuća alternativa za proizvodnju tih kemikalija istaknula se biomasa i njeni derivati. U tom pogledu lignocelulozna biomasa, kao najobilnija dostupna biomasa na svijetu i održivi izvor organskog ugljika od velike je važnosti (Isikgor i Becker, 2015). Lignocelulozne sirovine čine veliku skupinu sirovina biljne biomase i predstavljaju najobilniji izvor obnovljivog organskog materijala na Zemlji. Lignoceluloza nastaje procesom fotosinteze i rezultat je rasta biljaka koje koriste vodu i CO₂ za stvaranje jednostavnih šećera koje dalje mogu ugraditi u strukturu lignoceluloze. Glavne komponente strukture lignoceluloze su celuloza, hemiceluloza i lignin, a u manjem dijelu su prisutni pigmenti, proteini stanične stijenke, mineralne tvari i pektin (Chen, 2014). Velike količine lignocelulozne biomase, koja se smatra otpadom, zbrinjava se spaljivanjem unatoč njenom velikom potencijalu za primjenu u proizvodnji različitih proizvoda dodane vrijednosti kao što su biogoriva, biokemikalije i biopolimeri (Howard i sur., 2003). Prednosti upotrebe lignoceluloznih sirovina u odnosu na šećerne i škrobne sirovine je njihova niska cijena, laka dostupnost i široka raspostranjenost diljem svijeta (Isikgor i Becker, 2015; Zhang i sur., 2012). Unatoč svim prednostima, korištenje lignoceluloznih sirovina u komercijalnoj proizvodnji biogoriva je rijetko zbog njene složene strukture i otpornosti na enzimsku i kemijsku hidrolizu zahvaljujući njenim fizikalno-kemijskim svojstvima.

2.2.1. Sastav i struktura lignoceluloznih sirovina

Kemijski sastav biljaka znatno se razlikuje zbog genetičkih i ekoloških čimbenika (Malherbe i Cloete, 2002). Glavna građevna jedinica biljaka je lignoceluloza koja je kompaktna, djelomično kristalizirana struktura koju izgrađuju linearan polisaharid celuloza, razgranat heteropolisaharid hemiceluloza i razgranat lignin (Slika 1). To su polimeri koje biljke proizvode u svojim stanicama, a njihov udio u strukturi razlikuje se ovisno o sirovini (Singh i sur., 2009; Taherzadeh i Keikhsro, 2008). Polimeri od kojih se sastoje lignocelulozni materijali međusobno su povezani jakim kovalentnim i slabijim nekovalentnim vezama, te tako tvore mikrofibrile koji kada se međusobno povežu čine makrofibrile. Prosječni sastav lignoceluloznih materijala je: celuloza (30-50%), hemiceluloza (20-40%), lignin (15-25%) i ostali sastojci (5-35%) (Slika 1) (Lee i sur., 2007; Palonen, 2004).



Slika 1. Struktura lignoceluloznih sirovina (prilagođeno iz Isikgor i Becker, 2015).

2.2.1.1. Celuloza

Celuloza ($C_6H_{10}O_5$)_n je glavni sastojak drva i biljnih vlakana. Nalazi se u staničnim stijenkama biljaka, ponajviše u stabljikama i deblu. Netopljiva je u vodi, nema okusa i mikrokristalne je strukture (Malherbe i Cloete, 2002). Građena je od lanaca sastavljenih od jedinica D-glukoze. Jedinice glukoze su vezane β -1,4-vezom (Slika 1), pri čemu hidroksilna skupina jedne glukozne jedinice tvori vodikove veze s kisikovim atomima drugog lanca. Susjedni lanci, povezani vodikovim vezama i Van der Waalsovima silama, zauzimaju paralelan položaj, tvoreći kristalnu strukturu te na taj način smanjuju dostupnost enzima (Adapa i sur., 2009). Takvim načinom povezivanja tvore snopove nalik na kabel koji se nazivaju fibrilima koji su međusobno povezani hemicelulozom i drugim polimerima kao što su pektin i lignin (Adapa i sur., 2009; Malherbe i Cloete, 2002). Povezivanjem fibrila jedan uz drugi formiraju se mikrofibrili koji su otporni na naprezanje istezanjem. Stupanj polimerizacije celuloze je pojam koji govori koliko je glukoznih jedinica povezano u celulozi. On može biti različit, ovisno o biljci, a kreće se od 2000 do 27 000 (Saha, 2004).

2.2.1.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza je topljivija od celuloze, a uglavnom se sastoji od ksilana koji su glavni sastojci trava i drveta (Malherbe i Cloete, 2002). Ima nasumičnu, razgranatu i manje stabilnu strukturu (Slika 1.) te zbog grananja tvori amorfnu strukturu koja se uz pomoć kiselina lakše

hidrolizira od celuloze (Beg i sur., 2001). Hemiceluloze drvenastih biljaka obično se sastoje od *D*-ksiloze, *D*-manoze, *D*-galaktoze, *D*-glukoze, *L*-arabinoze, *D*-glukuronske kiseline i *D*-galakturonske kiseline, a hemiceluloze trava i žitarica najčešće su velikim dijelom sastavljene od *D*-ksiloze, *D*-galaktoze, *D*-glukoze i *L*-arabinoze, no u ovim polimerima postoji veća raznolikost strukture (Puls, 1997). Ksilani se sastoje uglavnom od *D*-ksiloze kao monomera i jednim dijelom *L*-arabinoze. Povezani su kovalentnim vezama s ligninom i njihove nekovalentne interakcije mogu biti od velike važnosti u održavanju čvrstoće biljnog materijala. Okosnicu ksilana čine molekule ksiloze koje su međusobno povezane s β -1,4 glikozidnim vezama (Beg i sur., 2001). Učestalost grananja i sastav bočnih grupa ovisi o vrsti izvora ksilana. Hemiceluloza sadrži, osim ksiloze, i druge kiseline kao što su npr. glukuronska, octena, ferulinska i *p*-kumarinska kiselina, te šećer arabinozu (Saha, 2004). Acetilne jedinice nalaze se kao bočni lanci najčešće na C3 položaju i zaslužne su za djelomičnu topljivost ksilana u vodi (Beg i sur., 2001). Sloj ksilana se kovalentno veže za lignin, a nekovalentno za celulozu i zato je važan za integritet biljne stanice i štiti vlakna od enzimske razgradnje

2.2.1.3. Lignin

Lignin je treća velika komponenta biljnog materijala. To je obično drugi najzastupljeniji organski polimer biljaka koji čini 20 - 40% drvenastih biljaka ili 15 - 20% strukture travastih biljaka (Chen, 2014). Kao što je slučaj s hemicelulozom, lignin je heteropolimer. Monomeri lignina su nelinearno i nasumično povezani, a tri najčešća monomera su kumaril alkohol, sinapil alkohol i koniferil alkohol. Tijekom separacije lignina, zbog mehaničkih, kemijskih i enzimskih metoda koje se koriste, dolazi do djelomične degradacije lignina (Chen, 2014). Cjeloviti lignin je netopiv u bilo kojem otapalu zbog brojnih intramolekulskih i intermolekulskih vodikovih veza koje su posljedica hidroksilnih i drugih polarnih skupina u strukturi lignina (Chen, 2014). Lignin utječe na čvrstoću staničnih stijenki biljnih stanica, poboljšava hidrofobna svojstva stijenke, sudjeluje u transportu mineralnih tvari te štiti od patogenih mikroorganizama (Liu, 2018).

2.2.2. Obrada lignoceluloznih sirovina

Očito je da je lignoceluloza kemijski stabilan, robustan i kompleksan materijal koji se teško razgrađuje. Predobrada lignoceluloznih sirovina je nužan korak u procesu proizvodnje jer mikroorganizmi ne mogu koristiti lignocelulozne materijale u njihovom prvotnom obliku nego samo jednostavnije gradivne jedinice celuloze, hemiceluloze i lignina. Zbog toga je predobrada vrlo važan korak, jer količina dostupnog supstrata, a samim time i rast mikroorganizma i proizvodnja vrijednih metabolita, ovisi o učinkovitosti predobrade. Ciljevi predobrade su uklanjanje lignina i hemiceluloze, reduciranje kristaličnosti celuloze te povećanje poroznosti lignocelulozne sirovine. Predobrada mora zadovoljavati sljedeće kriterije: formiranje fermentabilnih šećera tijekom predobrade ili povećanje efikasnosti kasnije enzimske hidrolize; sprječavanje degradacije i gubitka ugljikohidrata; izbjegavanje formiranja nusprodukata koji djeluju inhibitorno na proces hidrolize i/ili fermentacije te ekonomska isplativost (Kumar i sur., 2009). Postoji više načina na koje se može provesti predobrada lignoceluloznih sirovina, a mogu se podijeliti na fizikalne, kemijske i biološke metode (Bušić i sur., 2018; Kostylev i sur., 2012).

2.2.2.1. Fizikalne metode predobrade

Fizikalnim metodama predobrade postiže se povećanje kontaktne površine lignocelulozne sirovine uslijed smanjenja stupnja polimerizacije, djelomične ili potpune hidrolize hemiceluloze te smanjenje kristaličnosti celuloze (Bajpai, 2016). Mehaničkim usitnjavanjem i mljevenjem povećava se uspješnost enzimske hidrolize lignoceluloznog materijala. Neke metode fizikalne predobrade su: mljevenje u prah kombinacijom različitih metoda usitnjavanja; piroliza; zračenje lignoceluloze γ -zrakama koje cijepaju β -1,4-glikozidnu vezu, dajući tako veću površinu i nižu kristaličnost. Glavni nedostaci i problemi metoda fizikalne predobrade sirovine su visoka potrošnja energije, velike oscilacije u cijeni i uspješnosti predobrade te slabije uklanjanje lignina u usporedbi s drugim metodama predobrade (Mousdale, 2008).

2.2.2.2. Fizikalno-kemijske metode predobrade

Ova kategorija uključuje predobrade koje su kombinacije fizikalnih i kemijskih metoda. Predobrade ove vrste iskorištavaju uvjete i komponente koje utječu na fizičke i kemijske karakteristike lignocelulozne biomase (Agbor i sur., 2011). Najčešće korištena i najistraživanija metoda je eksplozija vodenom parom (eng. „steam explosion“), kod koje se lignocelulozna sirovina tretira zasićenom vodenom parom temperature od 160°C do 240°C i

tlakom između 6 i 34 bara. Ovaj tlak se drži od nekoliko sekundi do nekoliko minuta nakon čega se naglo snižava na atmosferski, rezultirajući eksplozivnom dekompresijom materijala. Tijekom predobrade, hemiceluloza se otapa u tekućoj fazi u obliku oligomernih i monomernih ugljikohidrata, lignin se transformira uslijed djelovanja visoke temperature, a celulozi se povećava udio amorfne celuloze u krutoj fazi što je čini podložnijom enzimskoj hidrolizi (Agbor i sur., 2011; Galbe i Zacchi, 2007). Slična metoda je i eksplozivna dekompozicija u prisustvu amonijaka (eng. „ammonia fibre explosion“), kod koje se lignocelulozna biomasa tretira otopinom amonijaka pri visokoj temperaturi i tlaku kroz određeni vremenski period. Dodatni primjeri fizikalno-kemijskih metoda su: eksplozija ugljikovim dioksidom, kombinacija predobrade kalcijevim hidroksidom i mokre oksidacijske predobrade (eng. „lime pretreatment and wet oxidative pretreatment“) te tretman vrućom vodom (hidrotermoliza) (Agbor i sur., 2011; Kumar i sur., 2009; Galbe i Zacchi, 2007). Glavni nedostaci ovih metoda su nepotpuno uklanjanje lignina i nastajanje inhibitora fermentacije, dok su glavne prednosti niža potrošnja energije u usporedbi s fizikalnim metodama i smanjena upotreba kemikalija u odnosu na kemijske metode (Barrett i sur., 2009).

2.2.2.3. Biološke metode predobrade

Većina postojećih procesa predobrade, konkretno fizikalni i termokemijski, zahtijevaju skupe instrumente ili opremu koja ima visoke energetske zahtjeve. Glavni izvori fermentibilnih šećera u otpadnoj lignoceluloznoj biomasi su celuloza i hemiceluloza koje su vrlo otporne na mikrobnu razgradnju, zbog svoje složene i kompaktne strukture s malo dostupnih mjesta za vezanje enzima (Andlar i sur., 2018). Biološka predobrada provodi se primjenom organizama ili enzima koji razgrađuju lignin i hemicelulozu, kao što su gljive bijelog, smeđeg i mekog truljenja. Najvažnija i najraširenija skupina organizama, koji doprinose enzimskoj razgradnji lignoceluloznog materijala, su gljive ili bakterije, koje se mogu izolirati iz različitih prirodnih staništa, kao što su: tlo, ostaci usjeva, kompost, kora drveća, kukci itd. (Andlar i sur., 2018). Gljive koje proizvode lignocelulolitičke enzime su široko rasprostranjene i uključuju vrste iz rodova *Ascomycetes* (npr. *Trichoderma reesei*) i *Basidiomycetes* koje pripadaju u gljive bijelog truljenja (npr. *Phanerochaete chrysosporium*), gljive smeđeg truljenja (npr. *Fomitopsis palustris*) i nekoliko vrsta koje razgrađuju celulozu u gastrointestinalnom traktu preživača (npr. *Orpinomyces* sp.) (Andlar i sur., 2018; Ljungdahl, 2008.). Gljive bijelog truljenja razgrađuju samo lignin ili simultano lignin i ostale sastojke lignoceluloznih materijala (Sigoillot i sur. 2012). Neke od ovih gljiva razgrađuju i lignin i celulozu proizvodeći važne ekstracelularne oksidativne i hidrolitičke enzime, dok gljive smeđeg truljenja hidroliziraju celulozu i

hemicelulozu, a djelomično modificiraju lignin. Gljive mekog truljenja izlučuju celulaže, enzime koji razgrađuju celulozu, ali ne i lignin, što dovodi do stvaranja mikroskopskih šupljina unutar drva (Abdel-Hamid i sur., 2013). Celulaže i većina hemicelulaza pripadaju skupini enzima poznatih kao glikozidne hidrolaze. Trenutno je identificirano više od 2500 glikozidnih hidrolaza klasificiranih u 115 obitelji (Cantarel i sur., 2009.). Gljive luče različite enzime ovisno o morfološkim značajkama mikroorganizma i čimbenicima okoliša. Različita morfologija rasta rezultat su različitih uvjeta uzgoja koji na kraju utječu na proizvodnju enzima (Papagianni, 2004).

2.2.2.3.1. Celulaže

Celulaže su enzimi koji provode hidrolizu celuloze na jednostavne šećere, a mogu se podijeliti u nekoliko skupina: endoglukanaze, egzoglukanaze i β -glukozidaze. Endoglukanaze razgrađuju celulozna vlakna niskog stupnja kristalizacije pri čemu nastaju slobodni krajevi celuloznog lanca, egzoglukanaze razgrađuju krajeve lanca celuloze oslobađajući celobiozu, a β -glukozidaze hidroliziraju jedinice celobioze na glukozu (Andlar i sur., 2018; Bušić i sur., 2018). Povećanje količine celulaza u procesu hidrolize povećava njen stupanj, ali znatno poskupljuje cijeli proces. Enzimska hidroliza pomoću celulaza najviše ovisi o nekoliko faktora koji su povezani s karakteristikama celuloze kao što su njena struktura, stupanj kristalizacije, dostupnost površine celuloze, stupanj polimerizacije i povezivanje s ligninom (Balat, 2011). Gljive koje su najviše istražene za proizvodnju celulaza pripadaju rodu *Trichoderma* (Sun i Cheng, 2002). *Trichoderma* vrste smatraju se najproduktivnijim mikroorganizmima za razgradnju celuloze, a *T. reesei* tijekom uzgoja može izlučiti do 100 g L⁻¹ enzima (Balat, 2011). Također, gljive koje imaju celulaznu aktivnost mogu pripadati gljivama mekog, smeđeg ili bijelog truljenja. Neke od gljiva mekog truljenja su *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Melanocarpus albomyces*; *Penicillium brasilianum*, *Trichoderma reesei*, *T. harzianum*, *Neurospora crassa*, *Mucor circinelloides*, *Trichoderma atroviride*. Gljivama smeđeg truljenja pripadaju *Coniophora puteana*, *Lanzites trabeum*, *Poria placenta*, *Tyromyces palustris*, *Fomitopsis sp.*, a gljivama bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium*, *Sporotrichum thermophile*, *Trametes versicolor*, *Agaricus arvensis*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia gigantea* (Kuhad i sur., 2011). U laboratorijskim istraživanjima najčešće se koristi koncentracija celulaza od 10 FPU g⁻¹ celuloze jer ta koncentracija omogućava oslobađanje visoke koncentracije glukoze u vremenu od 48 do 72 h.

Aktivnost celulaže ovisna je o temperaturi, najveću aktivnost pokazuju na $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$ i pH 4,5 do 5, dok se na temperaturi oko 80°C u potpunosti gubi aktivnost (Verardi i sur., 2012).

2.2.2.3.2. Ksilanaze

Hemiceluloza, sastavni dio lignoceluloznih sirovina, razgrađuje se pomoću ksilanaza koje pripadaju skupini glikozil hidrolaza. Ksilanaze su enzimi koji provode hidrolizu β -1,4-veza ksilana na jedinice ksiloze i ksilanooligosaharida. Ksilanaze se mogu podijeliti na tri načina, prema molekulskoj masi, prema kristalnoj strukturi i prema enzimskoj kinetici (Goswami i Rawat, 2015). Mjesto na kojem enzimi razgrađuju hemicelulozu ovisi o dužini lanca, stupnju grananja i prisutnosti supstituenata. Filamentozne gljive proizvode više ksilanaza od kvasaca i bakterija, ali proizvodnja ovisi i o korištenom mediju i supstratu. Ksilanaze proizvedene pomoću bakterija i aktinomiceta (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp.) djeluju u rasponu pH vrijednosti od 5 do 9 i optimalnoj temperaturi između 35 i 60°C . Za razliku od njih, ksilanaze proizvedene pomoću gljiva (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp.) imaju veću aktivnost te su optimalni uvjeti ispod 50°C i u rasponu pH vrijednosti od 4 do 6 (Sharma i Sharma, 2018). Ako se kao supstrat koristi celuloza zajedno s primjesama hemiceluloze, *Trichoderma* i *Aspergillus* vrste mogu proizvoditi celulaže i ksilanaze, ali ako je upotrijebljen supstrat ksilan tada proizvode samo ksilanaze (Goswami i Rawat, 2015). *Bacillus* sp. proizvodi ksilanaze bez prisutnosti celulaza za što su potrebni neutralni ili alkalni uvjeti i viša temperatura, te se iz tog razloga bakterijske ksilanaze koriste u industriji. Zbog smanjenja proizvodnih troškova enzima, za proizvodnju se sve češće koriste lignocelulozni supstrati kao što su šećerna trska, pšenične mekinje, rižina slama, klip kukuruza, pšenična slama, rižine ljuske, kukurozovina i dr. (Sharma i Sharma, 2018). *Trichoderma reesei* i *Bacillus subtilis* su vrste koje se komercijalno najčešće koriste za proizvodnju ksilanaza. Ksilanaze imaju primjenu u mnogim industrijama kao što su proizvodnja papira, hrane, tekstila, biogoriva i proizvodnja hrane za životinje. Također, ksilanaze se mogu koristiti u proizvodnji piva jer poboljšavaju ekstrakciju fermentabilnih šećera iz ječmenog slada ili u pekarskoj industriji kod enzimске hidrolize ne-škrobnih polisaharida jer se njihovom primjenom poboljšavaju reološka svojstva tijesta, specifični volumen kruha i čvrstoća mrvica (Goswami i Rawat, 2015).

2.2.2.3.3. Lignin degradirajući enzimi

Dok se polisaharidi u lignocelulozi uglavnom razgrađuju različitim hidrolazama, razgradnja lignina je oksidativni proces u kojem su fenol oksidaze ključni enzimi. Od njih najbolje proučeni enzimi su lignin peroksidaze (LiP), mangan peroksidaze (MnP) i lakaze. Postoje i drugi enzimi koji sudjeluju u procesima razgradnje lignina. To su različite oksidaze koje sadrže flavin, koje su ovisne o H_2O_2 (Andlar i sur., 2018).

2.2.2.3.4. Komercijalni enzimi za enzimsku hidrolizu lignoceluloznih sirovina

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

2.2.2.4. Kemijske metode predobrade

Postoji širok spektar različitih kemijskih metoda predobrade kojima se postiže povećanje kontaktne površine lignocelulozne sirovine, smanjenje stupnja polimerizacije, djelomična ili potpuna hidroliza hemiceluloze te djelomična razgradnja lignina. Za primjenu kemijskih metoda potrebno je koristiti opremu otpornu na agresivne kemikalije, a budući da prilikom takve predobrade nastaju toksični produkti, nužno je provesti detoksifikaciju dobivenog predobrađenog materijala. Također, nužno je što više iskorištenih kemikalija

reciklirati, tj. vratiti u novi proces, a ostatak odgovorno zbrinuti (Bušić i sur., 2018; Agbor i sur., 2011; Kumar i sur., 2009).

Neke od najčešćih metoda predobrade su: predobrada kiselinom, predobrada lužinom, organosolv, predobrada vodenom otopinom *N*-metilmorfolin-*N*-oksida te mnoge druge metode (predobrada ionskim tekućinama, ozonoliza, predobrada glicerolom).

2.2.2.4.1. Predobrada kiselinama

Ovom obradom se mljevena suha biomasa uranja u otopine kiselina različitih koncentracija pri određenim temperaturama te kroz određeni vremenski period. U kiselim medijima, hemiceluloza se, zbog prekidanja ksiloloznih veza te razgradnje acetilnih esterskih veza, najbrže hidrolizira do mono- i oligopolisaharida, dok se amorfne regije celuloze također degradiraju što dovodi do bubrenja celuloznih vlakana. Također dolazi do razgradnje lignina substitucijskim reakcijama i prekidanjem unutarmolekulskih veza popraćenih kondenzacijskim reakcijama koje sprječavaju njegovo otapanje (Candido i sur., 2012; Samuel i sur., 2010; Foston i Ragauskas, 2010). Za kiselinsku preobradu lignocelulozne sirovine najčešće se koriste sumporna, klorovodična, nitratna ili fosfatna kiselina. Sumporna i fosfatna kiselina najčešće se koriste jer su relativno jeftine i efikasne u hidrolizi lignoceluloznih materijala. Fosfatna kiselina daje lošije rezultate, ali je ekološki prihvatljivija. Korištenjem klorovodične i nitratne kiseline postižu se bolji stupnjeve konverzije celuloze u jednostavnije šećere od sulfatne, no skuplje su od iste. Predobrada kiselinom može rezultirati poboljšanom enzimskom hidrolizom materijala čime se oslobađaju fermentabilni šećeri, no iako su snažni agensi za hidrolizu celuloze, također su korozivne, toksične i opasne kemikalije te ih je nakon provedenog procesa potrebno reciklirati (Agbor i sur., 2011). Stoga se najčešće provodi predobrada s razrijeđenim kiselinama, koje nije potrebno reciklirati, pri povišenim temperaturama od 140 do 215°C s vremenom zadržavanja od nekoliko sekundi do nekoliko minuta. Uz metodu eksplozije vodenom parom, predobrada razrijeđenim kiselinama je najistraživanija metoda predobrade (Agbor i sur., 2011; Sanchez i Cordona, 2007). Mala potrošnja kiseline je najveća prednost ove metode, jer direktno utječe na cijenu. Niska koncentracija kiselina (<1%) djeluje na ispuštanje esencijalnih nutrijenta iz sirovine koji povećavaju efikasnost fermentacije. Varijacija ovog procesa je dvostupanjska predobrada, u prvom stupnju primjenom razrijeđene kiseline dolazi do otapanja hemiceluloze, dok u drugom stupnju uslijed djelovanja koncentrirane kiseline dolazi do hidrolize celuloze i preostale hemiceluloze (Nguyen, 2000). Primjenom kiseline se tijekom provođenja metode oslobađaju oligomerni i monomerni šećeri iz lignoceluloznog

materijala te utječe na reaktivnost njenih ugljikohidratnih polimera. S obzirom na kombiniranu jačinu predobrade, šećeri mogu biti konvertirani u aldehide kao što su furfural i hidroksimetil furfural koji su inhibitori fermentacije (Agbor i sur., 2011).

Najčešće se za predobradu razrijeđenom kiselinom koristi H_2SO_4 u koncentraciji do 4% m m^{-1} , pri čemu uglavnom dolazi do razgradnje hemiceluloze. Naime, brzina hidrolize hemiceluloze kiselinama značajno je brža od hidrolize celuloze (Lenihan i sur., 2010). No tijekom ove predobrade nastaju i toksični spojevi koje mogu negativno utjecati na procese enzimske hidrolize i fermentaciju (Palmqvist i Hagerdal, 2000). Koncentracija toksičnih spojeva povećava se s povećanjem temperature i vremena zadržavanja. Osim toga, nakon kiselinske predobrade potrebno je neutralizirati nastali lignocelulozni hidrolizat, a ukoliko se za neutralizaciju koristi gašeno vapno nastaju velike količine kalcijevog sulfata (gipsa) koji je potrebno zbrinuti na odgovarajući način što također povećava troškove predobrade.

2.2.2.4.2. Predobrada lužinama

Alkalna predobrada lignoceluloznih sirovina provodi se s različitim lužinama pri nižim temperaturama i tlakovima u usporedbi s drugim metodama. No, predobrada u takvim uvjetima mora se provoditi duže vrijeme koje može varirati od nekoliko sati pa sve do nekoliko dana. Alkalna predobrada rezultira delignifikacijom sirovine uslijed hidrolize veze između lignina i ugljikohidrata, te je učinkovitija kod lignoceluloznih materijala koji sadrže manje količine lignina kao što su biljni i poljoprivredni ostaci (Galbe i Zacchi, 2007). Predobrada lužinom uzrokuje bubrenje vlakana što povećava unutarnju površinu, a ujedno se smanjuje stupanj polimerizacije i kristaličnosti celuloze, hidroliziraju esterske veze u hemicelulozi i povećava poroznost sirovine. (Cao i sur., 2012; Galbe i Zacchi, 2007). U usporedbi s kiselinskom hidrolizom, predobrada lužinom uzrokuje manji stupanj razgradnje šećera te nastaje manje inhibitora. Najčešće korištena lužina je natrijeva, a za alkalnu predobradu mogu se još upotrijebiti kalcijeva i kalijeva lužina te amonijev hidroksid (Kumar i sur., 2009). Alkalna predobrada ekstrahira hemiceluloze i proizvodi organske kiseline koje snižavaju pH vrijednost. Nakon predobrade dobiju se dvije faze, vlažna čvrsta faza, koja se uglavnom sastoji od celuloze, i tekuća faza koja sadrži otopljenu hemicelulozu, lignin i neke anorganske spojeve. Kruta faza se ispiri do neutralnosti, kako bi se uklonili inhibitori enzima te time povećala učinkovitost enzimske hidrolize (Bensah and Mensah, 2013).

Glavni nedostatak alkalne predobrade je neprikladnost za drvenaste sirovine zbog potrebe za ekstremnim uvjetima predobrade pri kojima dolazi do nastajanja inhibitora te

gubitka hemiceluloze. Prilikom neutralizacije nastaju soli koje mogu otežavati zbrinjavanje otpada te otežavaju pročišćavanje nastalih hidroksilata. Također se za enzimsku hidrolizu koristi značajna količina katalizatora, koje je potrebno reciklirati kako bi se povećala ekonomičnost procesa (Bensah i Mensah, 2013).

2.2.2.4.3. *Organosolv postupak*

Organosolv postupak je konceptualno sličan organosolv procesima pulpiranja na nižim stupnjem delignifikacije. Ovaj postupak može koristiti širok spektar organskih otapala ili mješavina vode i organskih otapala sa ili bez dodatka katalizatora kao što su HCl ili H₂SO₄. Organske kiseline, uključujući oksalnu, acetilsalicilnu i salicilnu kiselinu, također se mogu koristiti kao katalizatori u procesu otapanja hemiceluloze i ekstrakcije lignina (Sun i Cheng 2002). Većina ovih postupaka odvija se pri visokim temperaturama (100-250°C) koristeći alkohole s niskim (metanol i etanol) ili visokim vrelištem (etilen glikol, glicerol, tetrahidrofuril alkohol) ili neke druge organske spojeve uključujući etere, ketone, fenole, organske kiseline i dimetil sulfoksid. Organosolv postupci uklanjaju gotovo sav lignin i rezultiraju gotovo potpunim otapanjem hemiceluloze tako što hidroliziraju unutar molekulske veze u ligninu, te esterske veze između lignina i hemiceluloze, a prekidaju se i glikozidne veze u hemicelulozi i djelomično u celulozi, ovisno o uvjetima predobrade (Zhao i sur., 2009). Ovim postupkom proizvode se tri frakcije, izrazito čist lignin, hemicelulozni sirup koji sadrži pentoze i heksoze te relativno čista celulozna frakcija. Kruti dijelovi se nakon predobrade odvajaju filtracijom, te ispiru vodom kako bi se uklonilo otapalo odnosno produkti razgradnje koji mogu biti i inhibitori enzimske hidrolize ili fermentacije.

Postoji nekoliko varijacija organosolv postupka s obzirom na otapalo, katalizator te uvjete postupka.

Batelle organosolv postupak uključuje korištenje ternarne mješavine fenola, vode i HCl za frakcioniranje biomase pri otprilike 100°C i 1,01325 bar. Kiseline depolimerizira lignin i hidrolizira hemicelulozu, lignin se otapa u fenolu dok se monosaharidi otapaju u vodenoj fazi prilikom hlađenja mješavine. Sličan postupak je i Formasolv proces u kojem se koristi mravlja kiselina, voda i HCl za depolimerizaciju, oksidaciju i otapanje lignina i hemiceluloze te ekstrakciju šećera iz biomase. Mravlja kiselina dobro otapa lignin te se ovaj postupak može provoditi pri nižim temperaturama i atmosferskom tlaku, no ujedno može doći do formulacije predobrađenih supstrata što smanjuje dostupnost celuloze za hidrolizu. Supstrati se mogu deformilirati u alkalnim otopinama pri 120°C. Kupiainen i sur. (2012) koristili su ovaj postupak

(5-10% m m⁻¹ mravlje kiseline, bez katalizatora) za predobradu delignificirane pšenične slame pri temperaturama od 180 do 220°C. Prinos glukoze iznosio je 40% maksimalnog teoretskog (Kupiainen i sur., 2012).

Organosolv postupak koji koristi octenu kiselinu, vodu i HCl, nazvan Acetosolv, daje veće prinose od predhodno opisanog Formasolv postupka jer je gubitak mase tijekom provedbe procesa manji. Korištenje etanola u Etanosolv postupku omogućuje dobivanje visoko vrijednih produkata kao što su celuloza, bez sumporni lignin i obogaćena hemiceluloza. No ovaj proces se u usporedbi s Formasolvom, provodi pri višim temperaturama i tlakovima. Ujedno dolazi i do taloženja lignina zbog slabije topljivosti lignina u etanolu. Etanol je u usporedbi s drugim otapalima manje toksičan što izravno utječe na proces fermentacije. Generalno, manji omjeri etanola i vode pozitivno utječu na hidrolizu hemiceluloze i enzimsku razgradljivost predobrađenog supstrata s obzirom da je etanol inhibitor hidrolitičkih enzima. Etanosolv postupak se koristio u razvoju tehnologija kao što su Alcell i Lignol proces (koncept biorafinerije koji koristi 50% otopinu etanola za predobradu lignocelulozne sirovine, pri temperaturi od 200°C i 27,56 bar, kako bi se razdvojile različite komponente drvene biomase). Velika prednost Etanosolva je mogućnost rekuperacije etanola i vode, što smanjuje operativne troškove. Ostali produkti ovog postupka kao što su hemicelulozni sirup i lignin mogu se koristiti kao sirovine u proizvodnji visoko vrijednih kemikalija. Lignin dobiven ovim procesom ujedno posjeduje i antioksidativna svojstva (Pan i sur., 2006; Alriols i sur., 2010; Agbor i sur., 2011; Bensah i Mensah, 2013).

Iako su metode Organosolv postupka obećavajuće zbog velikog potencijala za dobivanje čistih nusproizvoda koji se mogu koristiti u proizvodnji visoko vrijednih biokemikalija, ovi postupci su generalno skupi zbog potrebe za visokim temperaturama i tlakovima. Također upotreba kiselina izaziva koroziju opreme što dodatno povećava troškove procesa. Postoje varijacije ovog postupka koje kombiniraju upotrebu kiseline i lužine, mikrovalovima potpomognut Organosolv, Organosolv postupak s mravljom kiselinom i vodikovim peroksidom (Milox proces) te mnogi drugi.

2.2.2.5. Ostale metode predobrade

Ionske tekućine su soli koje se sastoje od velikih uglavnom organskih kationa i malih anorganskih aniona, s malim stupnjem kationske simetrije te vrelištem ispod 100°C. Nezapaljive su, u tekućem obliku pri sobnoj temperaturi te imaju antistatičko djelovanje. Teško su hlapljive te posjeduju visoku termalnu stabilnost čak i pri temperaturama od oko 300°C, te

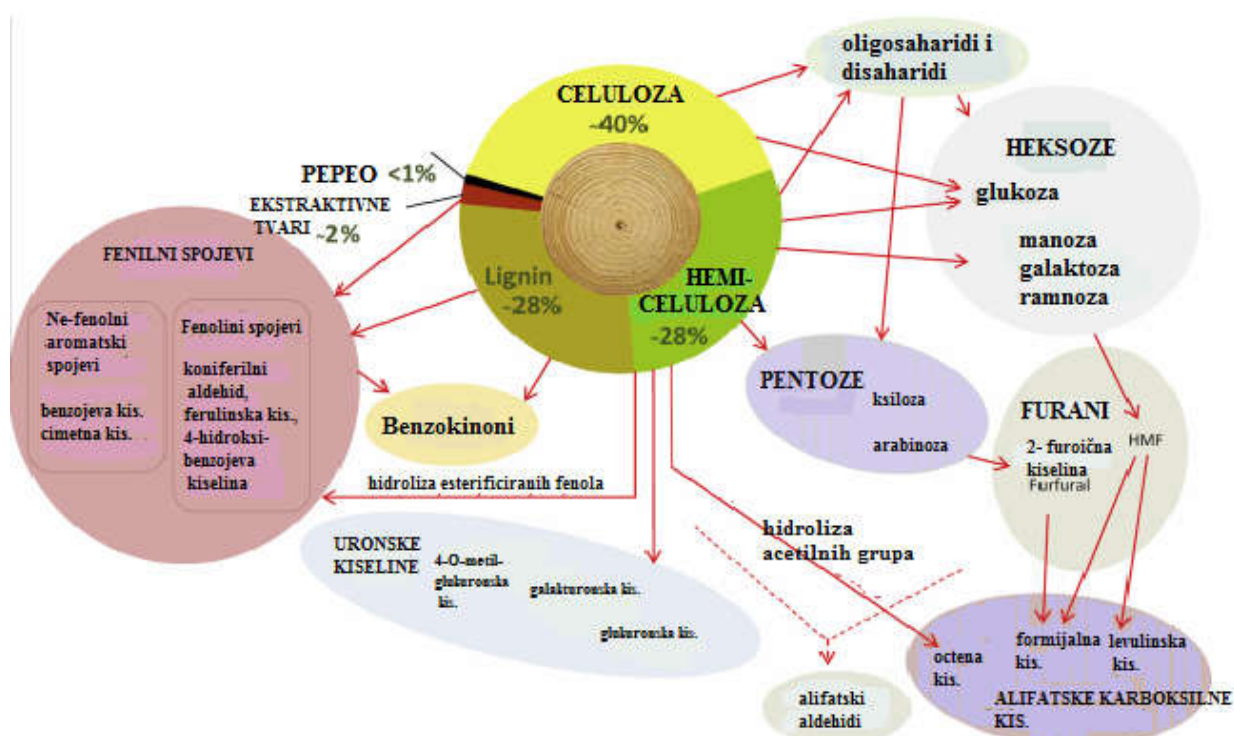
su stabilne u vodi (Bensah i Mensah, 2013). Ovom metodom se mješavina sirovine i ionske tekućine, ponekad u prisustvu vode i kiseline, inkubira pri temperaturama od 80 do 160°C tijekom 10 min ili 24 h. Više temperature i duža vremena zadržavanja povećavaju efikasnost otapanja lignina (Perez-Pimienta i sur., 2013; Zhi-Guo i Hong-Zhang, 2012). Nakon toga se dodaje anti-otapalo (voda, metanol, aceton, etanol) kako bi došlo do taloženja celulozne frakcije. Supernatant se uklanja centrifugiranjem ili filtracijom, te se celuloza ispire destiliranom vodom, liofilizira i podvrgava enzimskoj hidrolizi. Ionska tekućina i anti-otapalo se razdvajaju destilacijom.

Ozonskom predobradom sirovine postiže se smanjenje sadržaja lignina, dok je hemiceluloza slabije razgrađena, a celuloza ostaje intaktna (Kumar i sur. 2009). Osim toga, tijekom ovog postupka koji se provodi na sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku ne dolazi do nastajanja toksičnih i inhibitornih nusproizvoda. No, budući da su potrebne velike količine ozona ovaj proces je veoma skup. Umjesto ozona mogu se koristiti i drugi oksidansi npr. vodikov peroksid (H_2O_2), peroctena kiselina ($C_2H_4O_3$), sumpor trioksid (SO_3) ili klordioksid (ClO_2) (Bensah i Mensah, 2013).

2.2.3. Inhibitori koji nastaju tijekom predobrade lignoceluloznih sirovina

Tijekom predobrade lignocelulozne sirovine na povišenim temperaturama nastaje niz kemijskih spojeva koji mogu imati inhibitorno djelovanje i na celulolitičke enzime i na rast proizvodnog mikroorganizma. Prema podrijetlu inhibitora mogu se podijeliti u tri skupine: (1) komponente prisutne u strukturi lignoceluloznih sirovina, (2) komponente nastale degradacijom lignoceluloznih sirovina i (3) komponente prisutne na lignoceluloznim sirovinama (Harmsen i sur., 2013). U prvu skupinu ubrajaju se tvari već prisutne u lignoceluloznoj biomasi, te tijekom degradacije polimera na njihove monomerne jedinice ujedno dolazi i do oslobađanja inhibirajućih aldehida i fenolnih komponenti. U strukturi hemiceluloze su prisutne različite kiseline (octena, glukuronska i galakturonska) koje također mogu imati inhibirajući učinak na rast proizvodnog mikroorganizma (Harmsen i sur., 2013). Najzastupljeniji inhibitori koji pripadaju drugoj skupini, odnosno nastaju razgradnjom lignocelulozne sirovine su: furan aldehidi, fenolni spojevi, karboksilne kiseline i derivati lignina. Za procese predobrade pomoću kiselina karakteristično je nastajanje furfurala degradacijom pentoza i 5-hidroksimetilfurfurala (HMF) razgradnjom heksoza. HMF se pri dužem izlaganju visokim temperaturama i visokim koncentracijama kiselina degradira do levulinske i mravlje kiseline, dok se furfural degradira do furoične i mravlje kiseline (Jönsson i Martin, 2015; Harmsen i sur., 2013). Hidrolizom acetilnih grupa u hemicelulozi nastaje octena

kiselina, a degradacijom lignina nastaju različiti fenolni spojevi (Jönsson i Martin, 2015). Najzastupljeniji fenolni spojevi su: 4-hidroksibenzojeva kiselina, 4-hidroksibenzaldehid, vanilin, dihidroksikoniferilni alkohol itd. Nastajanje inhibitora degradacijom lignocelulozne biomase prikazano je na Slici 2. U treću skupinu inhibitora spadaju one komponente koje su prisutne na lignoceluloznoj sirovini, ali nisu njen sastavni dio. Primjerice, ako se koristi lignocelulozna sirovina koja potječe iz zagađenog okoliša, na njoj se mogu nalaziti dušikovi i sumporni spojevi. Različiti dodatci koji se koriste u poljoprivredi i pesticidi također mogu inhibitorno djelovati na radni mikroorganizam (Harmsen i sur., 2013).



Slika 2. Nastajanje inhibitora bioprocesa pri razgradnji lignoceluloznih sirovina (prilagođeno iz Jönsson i Martin, 2015.)

2.3. Proizvodnja biokemikalija i biogoriva iz lignoceluloznih sirovina

Nakon provedene hidrolize lignoceluloznih sirovina, tekuća frakcija ima fermentabilne šećere koji se mogu koristiti u biotehnološkim procesima. Dobiveni hidrolizat smatra se potencijalnim održivim supstratom za proizvodnju biokemikalija poput etanola. Etanol nastaje mikrobnom fermentacijom šećera, a kako bi se mogao koristiti potrebno ga je izdvojiti i pročistiti (Bušić i sur., 2018).

Općenito, da bi proizvodnja etanola bila isplativa, fermentacijski proces treba biti uspješan. Parametri kojim se može ocijeniti uspješnost bioprocesa su prinos bioetanola koji bi trebao biti >90% od teoretskog i produktivnost proizvodnje bioetanola $>1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Također, važno je da radni mikroorganizam bude otporan na inhibitore, što omogućuje rast na lignoceluloznim hidrolizatima, te mora podnositi visoke koncentracije etanola, a kao zaštita cijelog bioprocesa korisno je da se proizvodnja provodi pri niskom pH ili povišenoj temperaturi (Balat, 2011).

2.3.1. Bioetanol

Bioetanol je obnovljivi izvor energije koji se proizvodi mikrobnom fermentacijom šećera (Sun i Cheng, 2001). Danas se bioetanol uglavnom koristi kao gorivo ili dodatak gorivu u pogonskim motorima, ali se može iskoristiti i kao sirovina u kemijskoj industriji (Rass-Hansen i sur., 2007). Oko 90% bioetanola proizvodi se u Sjedinjenim Američkim Državama i Brazilu (Ivančić Šantek i sur., 2016; Morales i sur., 2015; Koh i Ghazoul, 2008). Etanol je pogodno alternativno gorivo budući da se može miješati s benzinom u različitim omjerima ili se može koristiti kao apsolutni etanol u prilagođenim motorima (Bušić i sur., 2018), a ujedno pokazuje povoljnija svojstva u usporedbi s konvencionalnim gorivima kao što su veći oktanski broj, veća toplina isparavanja i manju toplinu sagorijevanja (Chen i Qiu, 2010). Oktanski broj određuje otpornost određenog benzina na detonantno izgaranje (McCromick, 2015), a dodatkom 10% vol vol⁻¹ etanola benzinu povećava se oktanski broj goriva za 3-4 (Ivančić-Šantek i sur., 2016). Nadalje, toplina isparavanja etanola iznosi 907 J g^{-1} dok je toplina isparavanja benzina 395 J g^{-1} . Kombinacija visokog oktanskog broja i visoke topline isparavanja omogućuje više iskorištenje etanola kao goriva u odnosu na benzin. Osim toga, molekula etanola sadrži 35 % više kisika od benzina, što pospješuje kompletno sagorijevanje goriva i tako smanjuje emisiju čestica u okolinu (Yüksel i Yüksel, 2004). Nadalje, upotrebom bioetanola smanjuje se emisija stakleničkih plinova, posebice ugljikovog monoksida i

dušikovih oksida kao i toksičnih aromatskih spojeva (Ivančić-Šantek i sur. 2016; Zhang i sur., 2012; Turner i sur., 2011). Usporedba fizikalno-kemijskih svojstava benzina i bioetanola prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Usporedba fizikalno-kemijskih svojstava benzina i etanola (Yüksel i Yüksel, 2004).

SVOJSTVA	Etanol	Benzin
Kemijski sastav	C ₂ H ₅ OH	Ugljikovodici C ₄ -C ₁₂
Molarna masa (g mol ⁻¹)	46,07	100-105
Oktanski broj	108	88-100
Gustoća (kg dm ⁻³)	0,79	0,69-0,79
Donja ogrijevna vrijednos (103 kJ dm ⁻³)	21,1	30-33
Vrelište °C	78	27-225
Ledište °C	-114	-40
Plamište °C	13	-43
Latentna toplota isparavnja (kJ kg ⁻¹)	854	289
Topljivost u vodi	topljiv	netopljiv
Temperatura samozapaljenja °C	423	257

Pri mješanju s benzinom, udio etanola može iznositi od 5% do 85% (goriva E5-E85), pri čemu je potrebno koristiti etanol čistoće od 95,5-99,8%. Smjesa 85 % etanola i 15 % benzina (E85) upotrebljava se samo u SAD-u i nekoliko europskih država, najviše Švedskoj, dok se u Brazilu koristi etanol sa svega 5% vode koji se naziva E100 (Ivančić-Šantek i sur., 2016). Za primjenu goriva s većim volumnim udjelom etanola kao E85, na tržištu su dostupni prilagođeni tzv. flexi-fuel automobili (Sun i Cheng, 2001).

Prema podacima iz 2018-te godine, ukupno je proizvedeno 28,57 milijardi galona bioetanola (1 US gal = 3,785 L) od čega 16,061 milijardi galona (56%) proizvedenih u SAD-u kao vodećem proizvođaču, nakon kojeg slijede Brazil sa 7,92 % i Europska Unija sa 5 % proizvodnje (RFA, 2018). Međutim, iako je godišnja proizvodnja bioetanola u porastu, proizvedena količina još uvijek predstavlja minimalni udio u godišnjoj potrošnji fosilnih goriva od 3,8 bilijuna litara (Morales i sur., 2015). Komercijalni bioetanol se većinom proizvodi iz škrobnih i šećernih sirovina (šećerna trska, šećerna repa, pšenica, kukuruz, krumpir, kasava) (Morales i sur., 2015). Za razliku od SAD-a gdje je kukuruz glavna sirovina za proizvodnju, u

Europi se za proizvodnju bioetanola druge generacije najčešće koriste slama i drugi poljoprivredni ostaci. Stupanj konverzije tih supstrata u etanol je relativno nizak što povećava troškove proizvodnje te čini etanol skupljim u odnosu na fosilna goriva (Correa i sur., 2019; Rass-Hansen i sur., 2007; Howard i sur., 2003). Upravo iz tog razloga, novija istraživanja usmjeravaju na razvijanje i poboljšanje procesa proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina.

2.3.1.1. Tehnike vođenja procesa proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina

Zbog kompleksnosti procesa proizvodnje bioetanola iz lignocelulozne biomase, cijena gotovog proizvoda je još uvijek veća od cijene etanola dobivenog iz šećerne trske, šećerne repe ili kukuruza (Ivančić Šantek i sur., 2016). Za konverziju lignocelulozne biomase u biogorivo, celuloza i hemiceluloza se moraju razgraditi na njihove sastavne monomere, odnosno jednostavne šećere koje radni mikroorganizam može metabolizirati (Kumar i sur., 2009). Stoga se proces proizvodnje biogoriva iz lignoceluloznih sirovina sastoji od četiri glavna koraka: (1) predobrada lignocelulozne sirovine, (2) hidroliza strukturnih ugljikohidrata (celuloze i hemiceluloze), (3) fermentacija pomoću odgovarajućeg radnog mikroorganizma i (4) izdvajanje i pročišćavanje proizvoda (npr. destilacija i dehidracija) (Bušić i sur., 2018). Proizvodnja bioetanola u biotehnoškom procesu može se voditi pomoću nekoliko različitih tehnika: odvojena hidroliza i fermentacija (SHF); simultana hidroliza (saharifikacija) i fermentacija (SSF); simultana hidroliza (saharifikacija) i ko-fermentacija (SScF) i integrirani bioprocenjski sustav (eng. „consolidated bioprocessing”, CBP).

Vođenje procesa tehnikom odvojene hidrolize i fermentacije (SHF) najstariji je način proizvodnje etanola. U ovom dvostupanjskom procesu u bioreaktor se dodaju različiti enzimski pripravci u cilju provedbe enzimske hidrolize predobrađene lignocelulozne biomase do monomernih šećera. Dobiveni hidrolizat se zatim u drugom reaktoru koristi kao supstrat fermentirajućim mikroorganizmima u proizvodnji biogoriva. Procesi hidrolize i fermentacije se provode odvojeno. Primjenom SHF procesa, koriste se optimalni uvjeti oba procesa jer se svaki odvija zasebno. Optimalna temperatura hidrolize za većinu komercijalnih enzima je 50°C, a fermentacija ovisi o korištenom organizmu, za kvasac od 28 do 32°C. Za fermentaciju pentoza i heksoza koriste se zasebni mikroorganizmi jer mikroorganizmi koji metaboliziraju pentoze rade puno sporije te su osjetljiviji na etanol i inhibitore od mikroorganizama koji koriste heksoze (Bušić i sur., 2018). Određeni šećeri koji nastaju tijekom hidrolize mogu djelovati inhibitory na celulaze (Pinaki i sur., 2015) što u konačnici dovodi do potrebe za većim

koncentracijama enzima kako bi se postigao željeni prinos etanola (Balat, 2011). Već male koncentracije do 6 g L^{-1} celobioze mogu smanjiti celulaznu aktivnost za 60% (Bušić i sur., 2018). Osim toga, nedostatak SHF procesa je dugo trajanje svake faze procesa i potreba za većim kapitalnim ulaganjima (Pinaki i sur., 2015).

Razlika procesa simultane hidrolize i fermentacije (SSF), u usporedbi s SHF procesom je što hidrolizirane šećere istovremeno koristi radni mikroorganizam, odnosno hidroliza i fermentacija provode se u jednom bioreaktoru (Pinaki i sur., 2015). Ovi bioprocesi imaju veliki potencijal za industrijsku primjenu jer se izbjegava pojava inhibicije supstratom (ili drugim sastojcima hidrolizata sirovine). Jednostavni šećeri (glukoza) oslobođeni enzimskom hidrolizom se ne akumuliraju već se direktno fermentiraju što dovodi do viših prinosa etanola. Ovakav proces ima i neke druge prednosti, naime kraće je vrijeme trajanja bioprocasa, smanjuje se cijena procesa te se dobiva veći prinos etanola (Bušić i sur., 2018; Pinaki i sur., 2015). Osim toga, zbog provođenja procesa u jednom bioreaktoru smanjeni su rizici od kontaminacije (McIntosh i sur., 2017). *T. reesei* i *S. cerevisiae* su najčešći mikroorganizmi koji se koriste za ovu vrstu bioprocasa. Osnovni nedostatak ovog načina proizvodnje su različiti optimalni uvjeti za enzimsku hidrolizu supstrata i alkoholno vrenje, zbog čega se ovakav proces provodi na 38°C . Budući da se bioproces vodi kod niže temperature od optimalne temperature za aktivnost celulolitičkih enzima, potrebno je primijeniti veće količine enzima za ošećerenje sirovine što poskupljuje proces proizvodnje. Također, nedostatak je inhibicija radnog mikroorganizma i enzima etanolom (Bušić i sur., 2018).

Noviji način proizvodnje etanola je proces simultane saharifikacije i kofermentacije (SScF). U ovom bioprocasu se hidroliza provodi simultano uz ko-fermentaciju heksoza i pentoza. Takav način proizvodnje nije prikladan za industrijsku proizvodnju etanola gdje se kao radni mikroorganizam najčešće koristi kvasac *Saccharomyces cerevisiae* zbog njegove nemogućnosti asimilacije pentoza. Ovakav proces zahtijeva približne optimalne uvjete temperature i pH za oba radna mikroorganizma, a ujedno smanjuje kapitalne troškove zbog kofermentacije (Bušić i sur., 2018). Primjer uspješne kofermentacije za proizvodnju etanola je proces proveden pomoću *C. shehatae* i *S. cerevisiae* (Pinaki i sur., 2015). Još jedna mogućnost je direktna mikrobna konverzija ili proizvodnja celulaza, hidroliza i fermentacija pomoću jednog mikroorganizma što se naziva konsolidirano bioprocesiranje (eng. „consolidated bioprocessing”, CBP). Takav bioproces smanjuje troškove proizvodnje enzima za hidrolizu, a bakterije istražene za ovaj bioproces su *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Thermoanaerobacter mathranii*, *Thermoanaerobium brockii* i

Clostridium thermosaccharolyticum. Navedene termofilne celulolitičke anaerobne bakterije mogu koristiti raznu biomasu za proizvodnju etanola, ali značajan problem njihove primjene predstavlja niska tolerancija etanola (Pinaki i sur., 2015).

Integrirani bioprocesni sustav (CBP) je proces u kojem se proizvodnja enzima, hidroliza biomase i fermentacija provode u jednom koraku. Primjena ovakvog načina proizvodnje ne zahtijeva mnogo bioprocesne opreme te je stoga ekonomičnija od proizvodnje tehnikama simultane ili odvojene hidrolize i fermentacije (Choudhary i sur., 2016). Glavni nedostatak ovog koncepta proizvodnje bioetanola je da još uvijek nije pronađen dovoljno učinkovit mikroorganizam koji ima sve potrebne fiziološke i tehnološke karakteristike. Stoga se fiziološke karakteristike mikroorganizama koji se već koriste u proizvodnji bioetanola nastoje poboljšati primjenom tehnika genetičkog inženjerstva (Rezić i sur., 2016).

Zadnji korak proizvodnje bioetanola je izolacija i pročišćavanje gdje najveću prepreku predstavljaju visoki troškovi energije koji su potrebni za odvajanje etanola od suviška vode. Destilacija je najkorištenija metoda za izdvajanje i koncentriranje etanola zbog visokih faktora koncentriranja te lakog prenošenja u veće mjerilo. U prvom koraku dobiva se 92,5 do 94% vol vol⁻¹ etanola, dok se u idućem koraku destilacijom uz promjenu tlaka ili azetroptom destilacijom dobiva bezvodni etanol (Bušić i sur., 2018). Značajan problem destilacije je potrošnja energije, pogotovo kad se destiliraju smjese s niskom početnom koncentracijom etanola, što otvara vrata alternativnim metodama kao što su različite membranske tehnike, tekućinska ekstrakcija, istiskivanje plinom (eng. „gas stripping“) i adsorpcija. Različite membrane pokazuju različite separacijske koeficijente, stoga je za komercijalnu upotrebu potrebno proizvesti jeftine membrane s visokom selektivnošću za etanol, no zbog velike vjerojatnosti degradacije uslijed spojeva koji se nalaze u podlozi, membrane se ne mogu koristiti samostalno, već je potrebno ugraditi jedinice za prethodnu obradu što povećava cijenu investicije. Tekućinska ekstrakcija je zanimljiva metoda zbog mogućnosti upotrebe organskih otapala, koja su netoksična za proizvodni mikroorganizam, kao što su masne kiseline, alkoholi i karboksilne kiseline. Ovo omogućava kontinuirano „*in situ*“ odvođenje etanola. Navedena otapala pokazuju obećavajuće rezultate ekstrahiranja etanola, no potrebno ih je dodatno istražiti. Nakon samog ekstrahiranja potrebno je izdvojiti etanol iz otapala, što se provodi destilacijom ili ponovnom ekstrakcijom. U usporedbi s konvencionalnom destilacijom ovo je energetski manje zahtjevno. Istiskivanje plinom je od svih navedenih metoda najzanimljivije zbog svoje jednostavnosti izvođenja, netoksičnosti, relativno dobrog izdvajanja etanola te mogućnosti kontinuiranog „*in situ*“ izdvajanja. Ukupna učinkovitost ovog procesa uvelike

ovisi o efikasnosti procesa izdvajanja etanola iz struje plina. Kao i sa ostalim alternativnim metodama i tu je potrebno provesti dodatna istraživanja i optimiranja za početak korištenja u industriji. Adsorpcija je kao metoda izdvajanja etanola iz fermentacijske smjese najmanje istraživana, iako pokazuje obećavajuće rezultate separiranja etanola iz binarne smjese. Za njenu implementaciju u industriju kao samostalne metode, ili u sklopu sustava s nekim drugim metodama, kao što su ozonizacija ili stripiranje, potrebno je provesti dodatna istraživanja (Bušić i sur., 2018).

2.3.2. Ksilitol

Ksilitol ($C_5H_{12}O_5$) je šećerni alkohol koji na svakom ugljikovom atomu ima vezanu hidroksilnu skupinu te se po okusu, slatkoći i izgledu može usporediti sa saharozom, a prirodno se formira u kori breze. Karakterizira ga visok stupanj slatkoće, a ima 40% manju kalorijsku vrijednost u odnosu na saharozu (de Albuquerque i sur., 2014). Posjeduje iznimna organoleptička svojstva kao što su dobra topljivost, niski glikemijski indeks i antikancerogena svojstva. Ksilitol se zbog svog djelotvornog učinka kod sprječavanja nastanka karijesa koristi u proizvodnji žvakaćih guma, vodica za usta te zubnih pasta. *Streptococcus mutans*, glavni uzročnik karijesa, ne može koristiti ksilitol kao izvor ugljika te se ne može vezati za zubni plak u prisustvu ksilitola. Također, ksilitol se nalazi u sirupima za sprječavanje upale uha kod djece jer inhibira rast glavnog patogenog mikroorganizma odgovornog za nastanak ove bolesti. Vrlo je važan u prehrani dijabetičara jer se kod ljudi vrlo sporo metabolizira do D-glukoze pa ne dolazi do naglog povećanja koncentracije inzulina. Uz to ima nižu energetska vrijednost i manje termogene učinke od saharoze ($2,4 \text{ cal g}^{-1}$ u usporedbi sa $4,0 \text{ cal g}^{-1}$; Chen i sur., 2010). Navedena svojstva pružaju mogućnost primjene ksilitola u liječenju bolesti poput dijabetesa, anemije, osteoporoze i akutnog otitisa (de Albuquerque i sur., 2014). Važne tehnološke značajke ksilitola poput akariogenosti, negativne topline otapanja, niske kalorijske vrijednosti čine ga poželjnom sirovinom u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Silva i sur., 1998). Osim toga, primjenjuje se u proizvodnji slatkiša, karamela, sladoleda, čokolada, marmelada i napitaka zbog toga što ne sudjeluje u Maillard-ovim reakcijama koje uzrokuju smeđu boju namirnica i ne uzrokuju redukciju nutritivne vrijednosti proteina (de Albuquerque i sur., 2014).

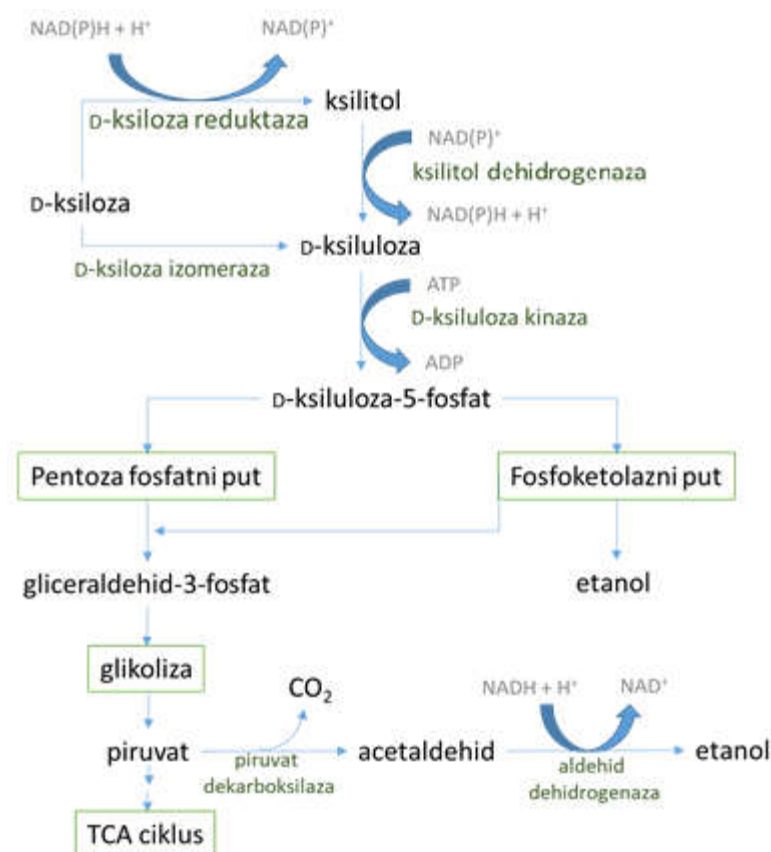
2.3.2.1. Proizvodnja ksilitola

Ksilitol se može dobiti kemijskim putem u reakciji hidrogeniranja ksiloze ili biotehnološkim postupkom primjenom odgovarajućeg mikroorganizma koji provodi konverziju ksiloze u ksilitol (de Albuquerque i sur., 2014). Proizvodnja ksilitola

biotehnološkim postupkom može se provesti na poljoprivrednim i agroindustrijskim otpadcima zbog njihove niske cijene. Biotehnološki postupak ima nekoliko prednosti u odnosu na kemijsku proizvodnju ksilitola, a odnose se na optimiranje i praćenje procesnih parametara kao što su temperatura, pH, tlak, visoku selektivnost i biorazgradivost proizvoda (Martínez i sur., 2007; Mosier i sur., 2005). Biotehnološka proizvodnja ksilitola iz lignoceluloznih sirovina započinje predobradom lignocelulozne sirovine s ciljem dobivanja fermentabilnih ugljikohidrata u hidrolizat koji će se koristiti kao izvor ugljika za mikroorganizme, posebice *D*-ksiloze iz hemiceluloze i glukoze (de Albuquerque i sur., 2014). Kiselinska hidroliza, kojom nastaje lignocelulozni hidrolizat, mora biti provedena pri uvjetima koji osiguravaju visoku koncentraciju ksiloze, relativno nisku koncentraciju inhibitornih spojeva prihvatljivu za odabrani radni mikroorganizam te visoku selektivnost prema razgradnji celuloze. Optimalni uvjeti za proizvodnju ksilitola definirani su koncentracijom supstrata i inhibitora (Parajó i sur., 1998).

U biotehnološkoj proizvodnji ksilitola kao radni mikroorganizam primjenjuju se većinom bakterije i plijesni. Genetički modificirane bakterije koje imaju potencijal u proizvodnji ksilitola su *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Corynebacterium glutamicum* dok su glavni producenti ksilitola i dalje kvasci uzgojeni na hidrolizatu hemiceluloze poput *Candida athensensis*, *Candida tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces marxianus* i *Pichia stipitis* (de Albuquerque i sur., 2014), *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* i *Candida mogii* (Silva i sur., 1998). Navedeni mikroorganizmi proizvode ksilitol kao intermedijer u metabolizmu *D*-ksiloze (de Albuquerque i sur., 2014). Još jedan od mogućih proizvođača ksilitola je i plijesan *Mucor indicus* koja u aerobnim uvjetima raste u filamentoznom obliku, za koji je utvrđeno da ima nizak prinos u proizvodnji ksilitola (Dasgupta i sur., 2017). Najveća produktivnost ksilitola postiže se uzgojem *M. indicus* u aerobnim uvjetima s limitiranom količinom kisika jer u takvim uvjetima navedena plijesan raste u mješovitom obliku (filamentozni oblik i u obliku pojedinačnih stanica kvasca). Metabolički put pregradnje ksiloze do ksilitola prikazan je na Slici 3.

U biotehnološkoj proizvodnji ksilitola s pomoću kvasaca potrebno je optimirati parametre poput pH, temperature, aeracije, imobilizacije stanica te koncentracije inokuluma, zatim sastav podloge, odnosno odabrati izvore ugljika, dušika i mikronutrijenata te njihove koncentracije (Rafiqul i Mimi Sakinah, 2013).

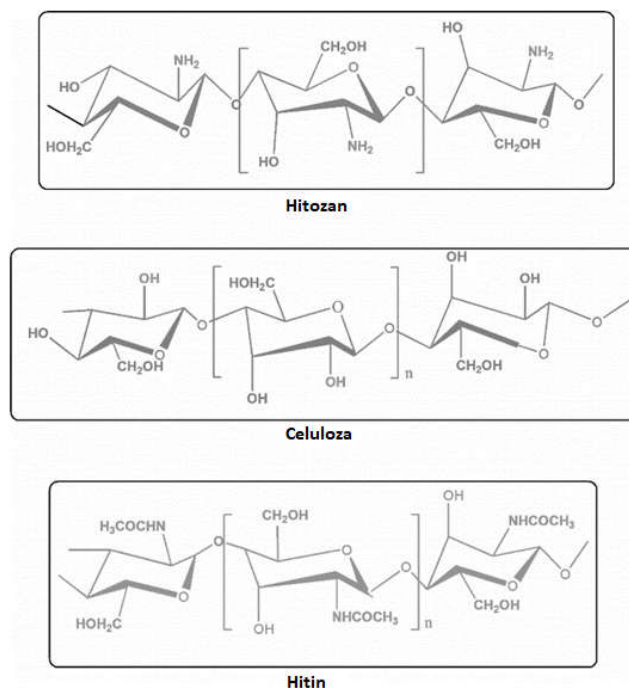


Slika 3. Metabolički put nastajanja ksilitola (prilagođeno iz Rafiqul i Mimi Sakinah, 2013).

2.3.3. Hitin i hitozan

Hitin (β - (1-4) -poli-*N*-acetil-*D*-glukozamin (($C_8H_{13}O_5$)_n) je široko rasprostranjen polimer u prirodi i drugi je najzastupljeniji polisaharid nakon celuloze. Ime hitin potječe od grčke riječi “hiton” što u prijevodu znači ogrtač. Prvi ga je opisao francuski kemičar Henri Braconnot 1811., dok je kemijsku strukturu odredio Albert Hofmann 1929. godine (Crini, 2019). Hitin je poluproziran te izrazito netopljiv materijal koji ima slična svojstva kao i celuloza (npr. netopljivost i niska kemijska reaktivnost), te se može smatrati polimerom čiju strukturu čini celulozna osnova u kojoj je hidroksilna skupina na položaju C-2 zamijenjena acetilamino skupinom. Monomerne jedinice 2-acetilamino-2-deoksi- β -*D*-glukoze međusobno su povezane β -(1,4) vezom. Dok se strukturalno hitin može usporediti s celulozom, u smislu funkcionalnosti sličniji je keratinu (Lenardon i sur., 2010). Monomerne šećerne jedinice u strukturi hitina rotirane su za 180° u odnosu jedna na drugu, te svaki par formira disaharid *N,N*-diacetilhitinbiozu (Beier i Bertilsson, 2013; Merzendorfer i Zimoch, 2003). Pojedinačni polimerni lanci mogu se opisati kao spirale, u kojima je svaki pojedini monomer invertiran s obzirom na susjedni monomer. Takva struktura dovodi do visoke stabilnosti jer su vrpce

povezane s 03-H $\rightarrow$ 05 i 06-H $\rightarrow$ 07 vodikovim vezama. Hitin se u prirodi javlja u obliku uređenih makrofibrila te je glavna strukturna komponenta egzoskeleta člankonožaca, rakova i škampi, te stanične stijenka gljiva (Slika 4), no suprotno vjerovanju da hitin daje čvrstoću oklopu, on zapravo daje mekoću i savitljivost, dok u kombinaciji sa strukturnim proteinima, on postaje tvrd i stabilan.



Slika 4. Strukturne formule hitozana, celuloze i hitina.

Hitin se javlja u tri različita kristalična alomorfa: α -, β -i γ -oblik (Merzendorfer i Zimoch, 2003), koji se razlikuju u usmjerenju mikrofibrila.

Najprisutniji oblik hitina je α -hitin. Kostur tvore dvije *N-N*-diacetilhitinbioze povezane u lanac. Dva susjedna lanca su u antiparalelnom položaju, te su suprotnih orijentacija, međusobno povezani 06 $\rightarrow$ 06 vodikovim vezama. Lanci se drže u slojevima 07 $\rightarrow$ H-N vodikovim vezama (Raafat i Sahl, 2009). Takva struktura omogućuje formiranje inter- i intramolekulskih vodikovih veza. Formacija intramolekularnih veza rezultira izrazito stabilnom strukturom. Polimerni lanci se povezuju u mikrofibrile prilikom kristalizacije (Gooday, 1990).

β -hitin je manje čest oblik hitina, u kojem su jedinice *N-N*-diacetilhitinbioze međusobno povezane 03-05 intramolekulskim vodikovim vezama, kao i kod α -hitina, formirajući čvrstu polimernu vrpcu (Badwan i sur., 2015). Lanci u ovoj strukturi održavaju se zajedno u slojevima vezama između amidnih grupa i -CH₂OH skupina bočnih lanaca sa

kisikovim atomom iz karbonilne skupine susjednih lanaca. To daje strukturu paralelnih poli-*N*-acetilglukozaminskih lanaca bez vodikovih veza između susjednih slojeva. Paralelno uređenje polimernih lanaca β -hitina daje veću fleksibilnost od antiparalelnog položaja α -hitina, bez gubitka stabilnosti strukture (Yen i Mau, 2009).

γ -hitin je treći alomorf koji u svojoj strukturi ima lance paralelne i antiparalelne orijentacije. Najčešće se javlja u staničnoj stijenci gljiva (Ospina Alvarez, 2014).

Imunogenost hitina je, unatoč prisutnosti dušika u strukturi, izrazito niska. Zbog niske topljivosti, te toksične i korozivne prirode otapala u kojima je hitin topljiv, za komercijalnu biomedicinsku primjenu, obično se pretvara u derivat, hitozan. Hitozan je deacetilirani oblik hitina (s različitim stupnjevima deacetilacije), te je topiv u razrijeđenim kiselinama s pH vrijednošću nižom od pH 6.0, kao što su octena, mravlja i mliječna kiselina (Azuma i sur., 2015; Baker i sur., 2007). Konverzija hitina u hitozan moguća je upotrebom različitih enzima (npr. hitin deacetilaze (EC 3.5.1.41)) ili kemijskom hidrolizom pomoću lužina (npr. vrućom koncentriranom otopinom NaOH) (Baker i sur., 2007; Rinaudo, 2007). Hitin i hitozan su biokompatibilni, biorazgradivi i netoksični biopolimeri, koji imaju antimikrobno djelovanje te se mogu koristiti kao hidratizirajući agensi. Procjenjuje se da godišnja svjetska proizvodnja hitina iznosi oko 10^{11} tona (Zagrag i sur., 2015). Zanimljivo je da se hitin ujedno smatra i glavnim izvorom onečišćenja plaža u obalnim područjima.

U organizmima kao što su gljive i beskralježnjaci, zabilježeni su različiti stupnjevi deacetilacije, rezultirajući širokim rasponom oblika između hitina (potpuno acetilirani) i hitozana (potpuno deacetilirani) (Yang, 2011). Za deacetilaciju hitina mogu se koristiti kiseline i lužine. Upotreba kiselina za deacetilaciju može dovesti do hidrolize hitinskog lanca zbog osjetljivosti glikozidnih veza na djelovanje kiselina koje uzrokuju pucanje vodikovih veza. Zbog navedenog češće se za deacetilacije koriste procesi s lužinama (Younes i Rinaudo, 2015; Hajjii i sur., 2014). *N*-deacetilacija hitina može biti izvedena heterogenim ili homogenim reakcijskim mješavinama (Merzendorfer i Zimoch, 2003). Hitin može biti deacetiliziran u takvoj mjeri da postaje topiv u razrijeđenoj octenoj i mravljoj kiselini. Stupanj acetilizacije hitina je obično oko 0.90, dok je hitozan potpuno ili djelomično deacetiliziran s tipičnim stupnjem deacetilacije višim od 0.65. Mnogi analitički alati koriste se za utvrđivanje stupnja deacetilacije uključujući IR spektroskopiju, plinsku kromatografiju, pirolizu, UV-Vis spektrofotometriju, NMR, razne titracijske metode, kiselinska hidroliza te HPLC metode (Kumar, 2000).

Izolacija hitina iz rakova, škampi i drugih organizama kao što su gljive izrazito je dugotrajan proces (Islam i sur., 2016). Ukupno trajanje procesa izolacije je od 17 do 72 sata, ovisno o vrsti sirovine. Dugotrajni procesi za izolaciju hitina energetski su zahtjevni, zbog čega rastu i troškovi proizvodnje. Metode ekstrakcije za dobivanje hitina i hitozana u literaturi značajno se razlikuju, jer u velikoj mjeri ovise o karakteristikama sirovine, koje variraju od jedne do druge vrste organizama (Colina i sur., 2018). Većina razvijenih tehnika oslanja se na kemijske procese hidrolize proteina te uklanjanje mineralnog ostatka. Neki procesi uključuju i dekolorizaciju dobivenog hitina tekućinskom ekstrakcijom ili oksidaciju preostalih pigmenata. Za dobivanje hitozana potrebno je provesti dodatni korak deacetilacije.

2.4. Potencijalni mikroorganizmi za proizvodnju biogoriva i biokemikalija u biorafinerijskom sustavu iz lignoceluloznih sirovina

Održivi biotehnološki procesi se baziraju na proizvodnji povećanog broja proizvoda pomoću mikroorganizama u različitim biorektorskim sustavima. Osnovni cilj biorafinerijskog sustava je iskoristiti velik potencijal mikroorganizama za dobivanje proizvoda poput biogoriva, biokemikalija i biopolimera iz obnovljivih sirovina. Mikroorganizmi zbog svoje fiziološke raznolikosti te sposobnosti rasta na različitim izvorima ugljika u različitim uvjetima mogu se koristiti kao radni mikroorganizmi u biorafinerijama baziranim na lignoceluloznim sirovinama. Primjena lignoceluloznih sirovina, poput pšenične slame, otpadne trave te kukuruzovine i kukuruznih oklasaka smatra se posebice interesantnom, jer takve sirovine predstavljaju izuzetno jeftin, lako dostupan i obnovljiv izvor organskog materijala (Marđetko i sur., 2018; Bušić i sur., 2018).

Predmet interesa ovog rada su kvasci te neke plijesni i bakterije koje su odabrane zbog svog biotehnološkog potencijala za proizvodnju raznolikog spektra proizvoda. Primjerice, plijesni koje se koriste u biotehnologiji mogu rasti na otpadnim lignoceluloznim sirovinama iz raznih industrija, a koriste se u industrijskim procesima zbog svoje metaboličke svestranosti, poznate po proizvodnji širokog spektra kemikalija, poput organskih kiselina, polisaharida, faktora rasta, pigmenata, antibiotika i enzima (Marđetko i sur., 2018; Bušić i sur., 2018; Andlar i sur., 2018). Uloga bakterija u suvremenoj biotehnologiji važna je zahvaljujući njihovoj iznimnoj fiziološkoj raznolikosti i prilagodljivosti na široki raspon uvjeta okoline (Imhoff, 2006). Nadalje njihova uporaba u biotehnologiji doprinosi ekonomskoj i ekološkoj održivosti procesa proizvodnje. Osim korištenja bakterija kao proizvođača raznih biokemikalija, neke bakterijske vrste se mogu koristiti u održavanju ekološke ravnoteže (Higuchi –Takeuchi i Numata, 2019). Dobar primjer su fototrofne bakterije, koje su sposobne rasti na otpadnim vodama iz različitih industrija. Korištenjem raznih procesa obrade sirovina i korištenjem raznih mikroorganizama u različitim fazama proizvodnog procesa, možemo razviti nove održive bioprocese za proizvodnju širokog spektra proizvoda te na taj način smanjujemo negativan utjecaj na okolinu, a povećavamo ekonomsku vrijednost proizvoda.

2.4.1. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

U komercijalnoj proizvodnji etanola najčešći korišteni mikroorganizam je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Ovaj radni mikroorganizam karakterizira GRAS status (eng. „Generally Recognized as Safe“), visoki prinos etanola ($\approx 0,45\text{--}0,50$ grama etanola po gramu glukoze), visoka produktivnost ($2\text{--}5\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$) te sposobnost rasta pri visokim koncentracijama šećera i etanola (Bušić i sur., 2018; Ivančić Šantek i sur., 2016). Kvasac može metabolizirati glukozu, fruktozu, saharozu i maltozu, ali ne i pentoze kao što je ksiloza. Osnovni put razgradnje glukoze u stanicama kvasca *S. cerevisiae* odvija se glikolizom (Embeden-Meyerhof-Parnasov put) u kojem iz jedne molekule glukoze nastaju dvije molekule piruvata. Piruvat se zatim u anaerobnim uvjetima dekarboksilira u acetaldehid, što katalizira enzim piruvat-dekarboksilaza. Acetaldehid se potom reducira djelovanjem enzima alkohol-dehidrogenaze u etanol što je popraćeno oksidacijom koenzima NADH u NAD^+ . Ovim putem razgradnje glukoze nastaju i dvije molekule ATP-a. Osim etanola, tijekom alkoholne fermentacije nastaju i ugljikov dioksid i drugi različiti nusproizvodi kao što su glicerol, organske kiseline, viši alkoholi. Iako je alkoholna fermentacija prirodno zaštićen proces, kontaminacije su moguće i to najčešće bakterijama mliječne kiseline, divljim kvascima i bakterijama octene kiseline. Budući da kontaminacija uzrokuje značajno smanjenje prinosa etanola i inhibiciju rasta kvasca, ona se suzbija primjenom antibiotika među kojima se najčešće koriste: penicilin (inhibira sintezu stanične stijenke) i virginiamicin (inhibira sintezu proteina) (Ivančić Šantek i sur., 2016). Za proizvodnju bioetanola iz hidrolizata lignocelulozne sirovine važna je sposobnost fermentacije ksiloze. Stoga se primjenom metoda genetičkog inženjerstva nastoji modificirati kvasac *S. cerevisiae* kako bi imao sposobnost rasta na pentozama (Marđetko i sur., 2018). Na taj način kvasac bi imao sposobnost konverzije ksiloze koja tijekom predobrade lignocelulozne sirovine nastaje razgradnjom hemiceluloze, a to bi povoljno utjecalo na iskorištenost supstrata i ekonomsku isplativost bioprocasa. Kvasci koji fermentiraju ksilozu su npr. *Pichia stipitis* i *Candida shehatae*, također bi se mogle koristiti za proizvodnju etanola, pogotovo na podlogama s visokim sadržajem ksilana. No njihova tolerancija na inhibirajuće spojeve u lignoceluloznim hidrolizatima je relativno mala (Olafsson i sur., 2008).

2.4.2. Plijesan *Mucor indicus*

Mucor indicus je dimorfna, nepatogena plijesan iz reda *Mucorales*. Plijesni iz ovoga reda tvore bijele, vunaste kolonije s malim točkama – sporangijima (Sharifia, 2007). Vunasta struktura kolonija ove plijesni posljedica je karakterističnog filamentoznog rasta hifa, ali *M. indicus* može rasti i u obliku pojedinačnih stanica kvasca formirajući individualne sferne stanice. Ovisno o uvjetima uzgoja, ova plijesan može prijeći s jednog načina rasta na drugi za

što je odgovorna aktivnost citokrom oksidaze, a moguća je i istovremena prisutnost oba načina rasta (Haidle i Storck, 1966). Uvjeti koji utječu na rast i morfologiju rasta su koncentracija spora plijesni u inokulumu, početna koncentracija šećera u podlozi, te atmosferski faktori poput prisutnosti kisika i ugljikova dioksida. Iako još nije poznat točan mehanizam utjecaja koncentracije spora na oblik rasta plijesni, eksperimentalno je dokazano da se korištenjem većih koncentracija spora u inokulumu (6×10^6 spora mL^{-1}) inducira rast plijesni u obliku pojedinačnih stanica kvasca. Suprotno tome, korištenjem manjih koncentracija spora u inokulumu, $3 (\pm 1) \times 10^4$ spora mL^{-1} , inducira se filamentozni rast plijesni (Sharifia i sur., 2008). U anaerobnim uvjetima, morfologija plijesni ovisi i o vrsti i koncentraciji prisutnih šećera. Za induciranje rasta u obliku pojedinačnih stanica koristi se glukoza, zatim fruktoza i manoza te galaktoza koja je najlošiji izvor energije za rast plijesni *M. indicus* u obliku pojedinačnih stanica. Tijekom uzgoja ove plijesni u podlozi s glukozom uočeno je da filamentozni rast, odnosno formiranje hifa, ovisi o početnoj koncentraciji glukoze u podlozi. Naime, za postizanje rasta u obliku pojedinačnih stanica potrebno je uzgoj provoditi u podlogama s minimalno 80 g L^{-1} glukoze kada dolazi do represije morfogeneze hifa plijesni (Karimi i Zamani, 2013). Utjecaj atmosferskih faktora, točnije prisutnost O_2 i CO_2 , na morfologiju plijesni, karakteristika je soja plijesni. Obično dolazi do rasta u obliku pojedinačnih stanica kada se uzgoj provodi pod atmosferom od minimalno 30% CO_2 i 70% N_2 . Prisutnost O_2 poništava utjecaj CO_2 , tako da već pri uzgoju pod atmosferom s 50% CO_2 i 50% zraka, plijesan raste isključivo u filamentoznom obliku (Karimi i Zamani, 2013). Utvrđeno je da se tijekom rasta u filamentoznom obliku u stanicama nalazi 50 puta veća koncentracija citokrom oksidaze u odnosu na slučaj kada plijesan raste u obliku pojedinačnih stanica (Haidle i Storck, 1966). Zato se rast u obliku pojedinačnih stanica može postići i dodatkom određenih kemikalija u podlogu koje inhibiraju sintezu ili aktivnost citokrom oksidaze. Nadalje, tijekom filamentoznog rasta moguće je, dodatkom 2-fenil etanola ili etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), potaknuti proces pupanja plijesni i rast u obliku pojedinačnih stanica (Karimi i Zamani, 2013). Na oblik rasta plijesni *M. indicus* utječe i pH vrijednost podloge. Ako plijesan raste u podlozi koja sadrži aminokiseline, smanjenje pH vrijednosti podloge rezultira filamentoznim rastom plijesni (Karimi i Zamani, 2013).

2.4.2.1. Sastav stanične stijenke *Mucor indicus*

Staničnu stijenku *M. indicus* najvećim dijelom čine hitin i hitozan. Ostale komponente su anionski polimeri (polifostati, glukuronan), proteini, lipidi i neki minerali (Mg^{2+} , Ca^{2+}). Hitin i hitozan čine 65,5% stanične stijenke *M. indicus* (Karimi i Zamani, 2013; Zamani i sur.,

2008). No postoje razlike u količinama glukozamina i *N*-acetilglukozamina prisutnih u staničnoj stijenci obzirom na morfologiju plijesni. Pokazano je da stijenke filamentoznih micelija imaju najviši udio glukozamina i *N*-acetilglukozamina (Mohmmadi i sur., 2012). Hitozan predstavlja vrijedan proizvod biomase ove plijesni zbog brojnih potencijalnih primjena koje uključuju njegovo antibakterijsko djelovanje, u medicini se može koristiti za izradu umjetne kože ili oftalmoloških leća, ima pogodna svojstva za izradu mikrokapsula, membrana i gelova u farmaceutskoj industriji pa se može primjenjivati kada je potrebno kontrolirano doziranje aktivne supstance lijekova (Majeti i Kumar, 2000).

2.4.2.2. *Proizvodnja etanola pomoću plijesni Mucor indicus*

Plijesan *M. indicus* može fermentirati različite šećere do etanola, uključujući glukozu, manozu, fruktozu i galaktozu, s prinosima koji su usporedivi s prinosima kvasca *S. cerevisiae*. Uz mogućnost konverzije navedenih šećera, *M. indicus* može rasti na ksilozi te kao glavni produkt metabolizma proizvodi etanol. Ksiloza je šećer prisutan u lignoceluloznim sirovinama, kao sastavni dio hemiceluloze, što plijesni *M. indicus* daje prednost pred kvascem *S. cerevisiae* za proizvodnju etanola iz lignoceluloznih sirovina. Morfologija plijesni neznatno utječe na proizvodnju etanola kao što se to vidi u Tablici 2. U proizvodnji etanola s pomoću plijesni u industrijskom mjerilu dolazi do operativnih poteškoća zbog filamentoznog rasta plijesni, kao što je otežano miješanje, praćenje procesa zbog ometanja mjernih uređaja, a ukoliko se radi s peletima, prijenos mase do i od središta peleta. *M. indicus* je Crabtree pozitivan mikroorganizam, što znači da uz anaerobnu proizvodnju etanola, etanol može proizvesti i u aerobnim uvjetima kada su u podlozi prisutne velike koncentracije šećera (Karimi i Zamani, 2013).

Tablica 2. Proizvodnja etanola različitim morfologijama *M. indicus* (Lennartsson i sur., 2009).

Uvjeti uzgoja biomase	Uvjeti fermentacije	Morfologija	Koeficijent konverzije glukoze u etanol (g g ⁻¹)
aerobno	aerobno	Filamentozna	0,40
aerobno	anaerobno	Filamentozna	0,42
aerobno	aerobno	Uglavnom filamentozna	0,40
aerobno	anaerobno	Uglavnom filamentozna	0,41
aerobno	aerobno	Uglavnom u obliku pojedinačnih stanica	0,41
aerobno	anaerobno	Uglavnom u obliku pojedinačnih stanica	0,42
anaerobno	aerobno	Pojedinačne stanice	0,39
anaerobno	anaerobno	Pojedinačne stanice	0,40

M. indicus naime proizvodi značajnu količinu enzima potrebnih za razgradnju sastojaka lignoceluloznih sirovina do monomera, te uspješno proizvodi etanol, unatoč prisutnosti inhibitora fermentacije kao što su npr. octena kiselina, furani i fenolni spojevi (Karimi i sur., 2006). Drugi način predobrade je tretiranje sirovine ili predobrađene sirovine hidrolitičkim enzimima. Na ovaj način uz oslobađanje šećera ne dolazi do formiranja spojeva toksičnih za rast mikroorganizama. U ovu se svrhu koriste hidrolitički enzimi čija optimalna temperatura za aktivnost iznosi 40 – 50°C. Optimalna temperatura za rast plijesni *M. indicus* je 28°C, a pokazalo se da plijesan može rasti i proizvoditi etanol i pri 38°C što je blizu optimalne temperature za aktivnost hidrolitičkih enzima, pa je moguće provođenje procesa simultane saharifikacije i fermentacije sirovine do etanola čime se smanjuju troškovi proizvodnog procesa (Millati i sur., 2005).

2.4.2.3. Proizvodnja masnih kiselina pomoću plijesni *Mucor indicus*

Osim proizvodnje etanola, tijekom uzgoja *M. indicus* dolazi i do nakupljanja znatnih količina lipida u stanicama ove plijesni. Glavninu tih lipida čine polinezasićene masne kiseline koje imaju potencijalnu primjenu u prehrambenoj industriji te u proizvodnji biodizela (Satari i sur., 2015). Jedna od najvažnijih polinezasićenih masnih kiselina je γ -linolna kiselina. Više istraživanja je pokazalo da *M. indicus* može proizvesti, među ostalima, upravo γ -linolnu

kiselinu (Jeennor i sur., 2008; Jeennor i sur., 2006). Kod plijesni koje imaju sposobnost nakupljanja lipida u stanicama, taj proces se inicira iscrpljivanjem izvora dušika iz podloge uz istovremeni suvišak izvora ugljika. Zbog nedostatka dušika, spriječena je proliferacija stanica, a postojeće stanice pretvaraju dostupni supstrat u lipide (Somashekar i sur., 2003).

2.4.2.4. Obrada otpadnih voda pomoću plijesni *Mucor indicus*

Uloga *M. indicus* u obradi otpadnih voda je uklanjanje teških metala koji predstavljaju problem zbog svoje toksičnosti i nakupljanja u hranidbenom lancu. Teške metale moguće je ukloniti kemijskim, fizikalnim ili biološkim metodama. Temelje se na primjeni mikroorganizama koji mogu tvoriti komplekse metalne ione pomoću liganda ili funkcijskih skupina na njihovoj vanjskoj površini (Yan i Viraraghavan, 2003). U tu se svrhu mogu koristiti žive ili mrtve stanice, ali i dijelovi stanica. Poteškoću vođenja procesa sa živim stanicama predstavlja održavanje stanica na životu jer je potrebno konstantno dovoditi hranjive tvari u proces. Takav se problem može izbjeći primjenom „mrtve“ biomase, koja se i dalje može koristiti za adsorptivno uklanjanje teških metala. Još jedna prednost mrtve biomase je to što se nakon adsorpcije, ione metala može eluirati s biomase koja se na taj način regenerira i može opet koristiti.

2.4.3. Ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum*

Ljubičaste nesumporne bakterije pripadaju fototrofnim ljubičastim bakterijama te čine njihovu najraznovrsniju skupinu (Novak i sur 2020; Imhoff i Trüper, 1989). Njihova raznolikost se očituje u varijacijama morfologije, strukture unutarnje membrane, sastavu proizvedenih karotenoida, korištenja izvora ugljika i elektron-donorima. Većina vrsta nesumpornih ljubičastih bakterija posjeduje bičeve kojima se kreće. Iako mogu rasti uz izvor svjetla i samo CO₂ kao izvor ugljika, većina vrsta preferira fotoheterotrofni rast na svjetlu i uz neki izvor ugljika kao što su masne kiseline, organske kiseline (sukcinat ili malat), alkoholi, ugljikohidrati i aromatski spojevi. Ljubičaste nesumporne bakterije su mikroaerofili, no neke vrste su iznimno osjetljive na prisutnost kisika, ali većina tolerira kisik te mogu rasti u aerobnim uvjetima bez svjetla. U uvjetima bez svjetla, sinteza fotosintetskih pigmenata je potisnuta te su kulture slabo obojene ili bezbojne (Rudolf i Grammel, 2012). Kao faktori rasta kod uzgoja ljubičastih nesumpornih bakterija obično su potrebni različiti vitamini: biotin, tiamin, niacin te *p*-aminobenzojeva kiselina. Kvašćev ekstrakt potiče rast većine vrsta bakterija. Trenutno su ljubičaste nesumporne bakterije podijeljene u šest rodova: *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopila*, *Rhodocyclus* i *Rhodobacter* (Imhoff,

1995). Ljubičaste nesumporne bakterije, izolirane iz raznih staništa, zanimljive su s ekološkog i ekonomskog aspekta jer se mogu koristiti u održivim procesima proizvodnje vodika kao biogoriva, za sintezu biokemikalija poput aminolevulinske kiseline za proizvodnju biopolimera (PHB), za sintezu specifičnih spojeva kao što su karotenoidi i fotosintetski pigmenti te za proizvodnju biomase (Novak i sur., 2017). Najčešće spominjana primjena ljubičastih nesumpornih bakterija je u proizvodnji 5-aminolevulinske kiseline (5-ALA). Ova se kiselina najviše proizvodi mikrobnom fermentacijom, najčešće s pomoću fotosintetskih bakterija zbog toga što je mikrobnom proizvodnja jednostavnija od kemijske sinteze te daje veće prinose (Liu i sur., 2014). Primjena genetički modificiranih sojeva daje do 50% veće prinose 5-ALA te je do sada proveden velik broj istraživanja s različitim sojevima fotosintetskih bakterija (Novak i sur., 2017; Meng i sur., 2016; Liu i sur., 2015; Xiu-yan i sur., 2005). Ova kiselina se može koristiti kao herbicid ili pojačivač biljne tolerancije na stres. Nema štetnog djelovanja na usjeve, ljude i životinje te je biorazgradiva. Osim toga, uočen je velik potencijal ALA na medicinskom polju zbog mogućnosti lokaliziranja tumora i fotodinamičke terapije (Nunkaew i sur., 2014; Nishikawa i sur., 1999).

Neke vrste ljubičastih nesumpornih bakterija mogu sintetizirati i polihidroksialkanoate (PHA), koji zbog biorazgradivosti i potencijala za proizvodnju bioplastike s novim svojstvima, imaju velik značaj za razvoj novih materijala. Ulažu se veliki naponi za smanjenje cijene PHA, primjenom mikroorganizama koji provode fotosintezu pa uz fiksaciju CO₂ istovremeno sintetiziraju PHA. Do sinteze PHA dolazi kada je rast stanice limitiran dušikom, fosforom ili sumporom, a izvor ugljika se nalazi u suvišku. Sintaza PHA je istraživana u nekoliko vrsta ljubičastih nesumpornih bakterija, između ostalih u *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides* i *Rhodopseudomonas palustris* (Higuchi-Takeuchi i sur., 2016). Uzgojem na butiratu kao jedinom izvoru ugljika pokazalo se da od navedenih triju vrsta najviše PHA u suhoj tvari biomase nakuplja bakterija *Rhodobacter sphaeroides* (do 70%), slijedi je *Rhodospirillum rubrum* (do 50%) dok *Rhodopseudomonas palustris* proizvodi najmanje PHA (oko 4%) (Higuchi-Takeuchi i sur., 2016). Osim proizvodnje PHA na kemijski definiranim izvorima ugljika, istražili su i potencijal ljubičastih nesumpornih bakterija za sintezu PHA tijekom obrade otpadnih voda u pilot postrojenju. Koristeći mikrobne kulture ljubičastih nesumpornih bakterija, došlo je do značajnog smanjenja organskog opterećenja, smanjila se koncentracija sumpornih spojeva, a proizvela se dostatna količina mikrobne biomase koja je sadržavala PHA (Sawayama i sur., 1999). Osim toga, ljubičaste nesumporne bakterije mogu proizvoditi vodik. Sagorijevanjem vodika nastaje voda kao glavni produkt, stoga se vodik

smatra čistim gorivom. U hranjivoj podlozi sa sukcinatom kao izvorom ugljika bakterija *Rhodospirillum rubrum* može proizvesti $21 \text{ mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ vodika. Pritom proizvodnja vodika traje 70 h nakon eksponencijalne faze rasta, iako je u stacionarnoj fazi rasta manja. Navedeni rezultati sugeriraju da proizvodnja vodika nije striktno povezana s rastom bakterijskih stanica (Bianchi i sur., 2008). U svijetu već postoji primjena ovog procesa, npr. u Španjolskoj je izgrađeno postrojenje za obradu otpadne vode iz domaćinstava s ciljem proizvodnje vodika (Vasiliadou i sur., 2018). Ljubičaste nesumporne bakterije također imaju sposobnost bioremedijacije. Imobilizirana bakterija *Rhodobacter sphaeroides* pokazala se uspješnom u obradi otpadnih voda tvornica papira i rafinerije šećera (Nagadomi i sur., 2000). Također se može koristiti za obradu otpadnih komunalnih i industrijskih voda. Takvim tretmanom značajno se smanjuju biološka potrošnja kisika te koncentracija organskih tvari, klorida, bikarbonata i sulfata pri čemu pH-vrijednost ostaje neutralna (Merugu i sur., 2014). S obzirom da mogu koristiti H_2S kao elektron-donor, ove bakterije se mogu koristiti za uklanjanje sumporovodika čime se smanjuju neugodni mirisi i toksičnost otpadnih voda (Bullard i sur., 2009).

Pripadnik skupine ljubičastih nesumpornih bakterija je i *Rhodovulum adriaticum* koja je gram-negativna, fotosintetska bakterija. Bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781, jedan od mikroorganizama korištenih u ovom radu, izolirana je iz uzoraka blata i vode iz jezera „Malo Jezero“ na otoku Mljetu (Neutzling i sur., 1984), a za rast i proizvodnju metabolita može koristiti glukozu, ksilozu i arabinozu kao izvor ugljika što je značajno jer su ovi šećeri prisutni u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina koji se koriste u biorafinerijskim sustavima (Novak i sur., 2017; Hiraishi i Ueda, 1995; Hiraishi i Ueda, 1994).

3. MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizmi za proizvodnju biogoriva i biokemikalija u biorafinerijskom sustavu iz otpadnih lignoceluloznih sirovina

Radni mikroorganizmi u ovom radu bile su plijesni *Fusarium verticillioides* JCM 23107 (FV), *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 (BD), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293 (FO), *Paecilomyces variotii* CBS 372.70 (PV), *Myceliophthora thermophila* CBS 663.74 (MT); *Thielavia terrestris* CBS 456.75 (TT), *Mucor indicus* DSM 2185 (MI), ljubičasta nesumporna bakterija *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 (RA) te kvasac *Saccharomyces cerevisiae* Y9 (ATCC® MYA-4941) iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva. Radne kulture plijesni i kvasca čuvane su na odgovarajućim hranjivim podlogama u Petrijevim zdjelicama na 4°C, dok je kultura ljubičastih nesumpornih bakterija čuvana u odgovarajućoj tekućoj podlozi u Erlenmeyerovim tikvicama na svjetlu i sobnoj temperaturi.

3.1.2. Sirovine, kemikalije i enzimi korišteni u istraživanju

Lignocelulozne sirovine korištene u ovim istraživanjima su pšenična slama (92% suhe tvari), otpadna trava (92% suhe tvari), kukuruzovina (91% suhe tvari) i kukuruzni oklasci (91% suhe tvari). Sastav lignoceluloznih sirovina, određen nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize (Poglavlje 3.2.1.3.), a prikazan je u Tablici 3. U Tablici 4. nalazi se sastav tekuće i čvrste faze kukuruznih oklasaka (PKO) određeni prethodno navedenom metodom, dobivenima nakon kiselinske hidrolize pri temperaturi od 180°C i vremenu zadržavanja od 10 min, koje su korištene u eksperimentima vezanima uz proizvodnju etanola, enzimsku hidrolizu i proizvodnju enzima.

Tablica 3. Sastav lignoceluloznih sirovina.

Tvar	pšenična slama	otpadna trava	kukuruzovina	kukuruzni oklasci
	w [%]	w [%]	w [%]	w [%]
glukani	51,93 ± 3,53	25,92 ± 1,19	40,32 ± 2,22	35 ± 1,74
ksilani	21,06 ± 1,43	12,55 ± 0,58	16,38 ± 0,90	26 ± 1,30
arabinani	5,12 ± 0,35	2,11 ± 0,10	3,49 ± 0,19	4 ± 0,20
topivi lignin	0,24 ± 0,02	2,47 ± 0,11	0,34 ± 0,11	0 ± 0
netopivi lignin + pepeo	15,88 ± 1,08	24,88 ± 1,14	26 ± 1,14	27 ± 1,34
octena kiselina	3,04 ± 0,21	1,47 ± 0,07	3,67 ± 0,07	4,35 ± 0,22
mravlja kiselina	2,21 ± 0,15	0,65 ± 0,03	3,01 ± 0,03	3 ± 0,15

Tablica 4. Sastav tekuće i krute faze dobivene nakon kiseline predobrade kukuruznih oklasaka (PKO).

Tvar	tekuća faza PKO	čvrsta faza PKO
	γ (g L ⁻¹)	w [%]
glukani	4,35 ± 1,10	55,58 ± 3,48
ksilani	23,60 ± 1,34	1,11 ± 0,07
arabinani	1,45 ± 0,68	0,48 ± 0,03
topivi lignin	1,45 ± 0,23% (w/v)	0,21 ± 0,01
netopivi lignin + pepeo	0 ± 0	27,30 ± 1,71
octena kiselina	3,82 ± 1,39	4,32 ± 0,27
mravlja kiselina	1,48 ± 0,42	4,31 ± 0,27
furani	0,97 ± 0,12	0 ± 0

Popis kemikalija korištenih u ovom istraživanju prikazan je u Tablici 5.

Tablica 5. Sirovine, kemikalije i komercijalni enzimi korišteni u istraživanju.

Kemikalija	Stupanj čistoće	Proizvođač
3-etilbenzotiazolin -6-sulfonska kiselina (ABTS)	>98%	Sigma-Aldrich, SAD
3,5-dinitrosalicilna kiselina (DNS)	≥98%	Sigma-Aldrich, SAD
acetonitril	≥ 99%	Sigma-Aldrich, SAD
agar	tehnički	Biolife, Italija
aktivni ugljen	p.a.	Kemika, Hrvatska
amonijak	≥ 99,9%	Sigma-Aldrich, SAD
amonijev acetat	≥ 98%	Merck KgaA, Njemačka
amonijev sulfat	≥ 99%	Honeywell, SAD
arabinan iz šećerne repe	>95%	Sigma-Aldrich, SAD
arabinogalaktan	>95%	Megazyme, Irska
arabinoksilan	95%	Megazyme, Irska
bakrov sulfat pentahidrat	99%	Honeywell, SAD
biotin	≥ 99%	Sigma-Aldrich, SAD
borna kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
Bradfordov reagens	p.a.	Bio-Rad, SAD
Briljantno plava G	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Cellulase, enzyme blend	za upotrebu u biotehnologiji	Sigma-Aldrich, SAD
cijanokobalamin	≥ 99%	Sigma-Aldrich, SAD
cinkov klorid	p.a.	Kemika, Hrvatska
cinkov sulfat heptahidrat	99%	Merck KgaA, Njemačka

citokrom <i>c</i> iz konjskog srca	≥95%	Sigma-Aldrich, SAD
Kongo crvenilo	≥35%	Sigma-Aldrich, SAD
diamonijev fosfat (DAP)	p.a.	Kemika, Hrvatska
diamonijev sulfat (DAS)	p.a.	Kemika, Hrvatska
dinitrosalicilna kiselina	96%	Kemika, Hrvatska
etanol	96%	GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska
fenol	99%	Kemika, Hrvatska
galaktomanan	98%	Megazyme, Irska
glicin	≥99%	Sigma-Aldrich, SAD
glukoza monohidrat	≥ 99%	Sigma-Aldrich, SAD
glutamat	≥ 99%	Sigma-Aldrich, SAD
kalcijev klorid dihidrat	p.a.	Merck, Njemačka
kalijev dihidrogenfosfat	≥ 99%	Kemika, Hrvatska
kalijev hidrogenfosfat	≥ 98%	Kemika, Hrvatska
kalijev natrijev tartarat	p.a.	Kemika, Hrvatska
karboksimetilceluloza	99%	Sigma-Aldrich, SAD
kimotripsin	p.a.	Roche, Švicarska
kobaltov klorid heksahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
ksiloza	≥ 99%	Sigma-Aldrich, SAD
ksilan iz bukve	>90%	Sigma-Aldrich, SAD
kukuruzna močevina	za upotrebu u biotehnologiji	Dynamite Baits, UK
kvašćev ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
Laemmli standard	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
laktoza	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
lihenan	80%	Megazyme, Irska
magnezijev sulfat heptahidrat	≥ 99%	LACH NER d.o.o., Češka
malat	≥ 99%	Sigma-Aldrich, SAD
manan iz <i>S. cerevisiae</i>	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
manganov klorid dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska

manganov sulfat	98%	Kemika, Hrvatska
mesni ekstrakt	za upotrebu u biotehnologiji	Liofilchem, Italija
mikrokristalična celuloza	99%	Sigma-Aldrich, SAD
mravlja kiselina	» 98%	Honeywell, SAD
natrijev hidroksid	≥ 98%	Merck KGaA, Njemačka
natrijev klorid	≥ 99%	Sigma-Aldrich, SAD
natrijev molibdat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev tartarat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
nikotinska kiselina	≥ 99%	Sigma-Aldrich, SAD
octena kiselina	99,5%	Avantor, SAD
pektin	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
pepton	za upotrebu u biotehnologiji	Fischer Scientific, UK
sumporna kiselina	96%	Merck KgaA, Njemačka
škrob iz riže	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
tiamin klorid	≥ 99%	Sigma-Aldrich, SAD
TRIZMA base	≥99.9%	Sigma-Aldrich, SAD
Tween 80	99%	Merck KgaA, Njemačka
urea	≥98%	Sigma-Aldrich, SAD
veratril alkohol	96%	Sigma-Aldrich, SAD
Viscozyme L	za upotrebu u biotehnologiji	Novozyme, Danska
željezov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska

3.1.3. Hranjive podloge

3.1.3.1. Hranjive podloge za održavanje radnih mikroorganizama

Čiste kulture plijesni *Fusarium verticillioides* JCM 23107 (FV), *Botryosphaeria dothidea* JCM 2738 (BD), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae* JCM 9293 (FO), *Paecilomyces variotii* CBS 372.70 (PV), *Myceliophthora thermophila* CBS 663.74 (MT); *Thielavia terrestris* CBS 456.75 (TT), *Mucor indicus* DSM 2185 (MI) održavane su na čvrstim podlogama sljedećeg sastava: 25 g L⁻¹ glukoze, 5 g L⁻¹ mesnog ekstrakta, 2 g L⁻¹ diamonijevog sulfata (DAS), 2 g L⁻¹ diamonijevog fosfata (DAP) i 20 g L⁻¹ agara.

Čista kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y9 održavana je na kosim podlogama sa sladnim agarom uz dodatak 20 g L⁻¹ glukoze.

Čista kultura bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 održavana je u tekućoj podlozi sljedećeg sastava: 2,7 g L⁻¹ malata, 2 g L⁻¹ natrijevog glutamatata, 1,5 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta, 0,8 g L⁻¹ diamonijevog sulfat heptahidrata, 0,5 g L⁻¹ kalijevog dihidrogenofosfata, 0,5 g L⁻¹ dikalijevog fosfata, 0,2 g L⁻¹ magnezij sulfat heptahidrata, 0,053 g L⁻¹ kalcij klorid dihidrata, 0,0012 g L⁻¹ mangan sulfat heptahidrata te po 1 x 10⁻³ g L⁻¹ nikotinske kiseline i tiamin klorida te 1 x 10⁻⁵ biotina. pH vrijednost podloge podešena je na 7 pH jedinica dodatkom natrijevog hidroksida. Za uzgoj inokuluma ove bakterije za fermentacije korištena je podloga istog sastava.

3.1.3.2. Hranjive podloge za uzgoj inokuluma plijesni *M. indicus* DSM 2185 i kvasca *S. cerevisiae* Y9

Za uzgoj inokuluma plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 i kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y9, pripremljena je hranjiva podloga koja je sadržavala 20 g L⁻¹ glukoze, 5 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta, 2 g L⁻¹ DAP i 2 g L⁻¹ DAS. Podloge su sterilizirane u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 min.

3.1.3.3. Hranjive podloge korištene u istraživanju lignocelulolitičke aktivnosti plijesni

Plijesni korištene za ispitivanje aktivnosti celulolitičkog enzima prethodno su kultivirane na podlozi opisanoj u poglavlju 3.1.3.1. na 30 °C tijekom 5 dana. Za promatranje aktivnosti celulolitičkih enzima, predkulture su prebačene na medij koji je sadržavao: 5 g L⁻¹ karboksimetil celuloze; 1 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta, 0,5 g L⁻¹ Kongo crvenila i 15 g L⁻¹ agara. Nakon 7 dana uzgoja na 30 °C, procjena enzimске aktivnosti provedena je određivanjem

promjera čiste zone formirane oko kolonije plijesni. Enzimski indeks (EI) izračunat je korištenjem jednadžbe 1.

$$EI = \text{promjer zone hidrolize} / \text{promjer kolonije} \quad (1)$$

Sastav medija koji su se koristili u eksperimentima kombinirane redosljedne fermentacije čvrstog substrata i submerzne fermentacije s ciljem odabira optimalne podloge i najboljih proizvođača lignocelulolitičkih enzima, dat je u Tablici 6. pH vrijednost medija je postavljena na 6 uz dodatak NaOH, a zatim je podloga sterilizirana na 121°C tijekom 15 min. Otopina soli je filtrirana kroz jednokratni sterilni filter i dodana u medij prije upotrebe (Tablica 6). Volumen podloge pripremljen u Erlenmeyerovim tikvicama bio je 250 mL. Za pripremu inokuluma korištene su podloge odgovarajućeg sastava uz dodatak 20 g L⁻¹ predobrađenih kukuruznih oklasaka (PKO). Podloge su sterilizirane u autoklavu pri 121°C tijekom 15 min.

Tablica 6. Sastav podloga za uzgoj plijesni za određivanje lignocelulolitičke aktivnosti.

Komponenta (g L ⁻¹)	Hranjiva podloga			
	1	2	3	4
Kvašćev ekstrakt	2	-	2	-
Pepton	5	2	5	-
Kukuruzna močevina	-	5	-	5
DAP	1,4	1,4	1,4	1,4
KH ₂ PO ₄	2	2	2	2
MgSO ₄	0,2	0,2	0,2	0,2
Urea	-	-	0,3	-
CaCl ₂	-	-	0,2	-
Tween 80	-	-	1	-
MnSO ₄	-	-	-	0,01
CuSO ₄	-	-	-	0,01
NaCl	-	-	-	0,1
Otopina soli* (%)	0,1	-	0,1	-

*Sastav otopine soli: 5 g L⁻¹ FeSO₄ × 7H₂O, 2 g L⁻¹ MnSO₄ × H₂O, 2 g L⁻¹ CuSO₄, 1,5 g L⁻¹ ZnSO₄ × 7H₂O, i 2 g L⁻¹ CoCl.

3.1.3.4. Hranjive podloge za uzgoj kvasca *S. cerevisiae* Y9 i plijesni *M. indicus* DSM 2185 u svrhu optimizacije procesa proizvodnje biogoriva i biokemikalija

U radu su korištene tri različite podloge za uzgoj u Erlenmeyerovim tikvicama. Hranjiva podloga (1) je sadržavala: 20 g L⁻¹ glukoze, 5 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta, 2 g L⁻¹ DAS i 2 g L⁻¹ DAP. Sastav hranjive podloge (2) je bio: 10 g L⁻¹ ksiloze, 5 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta, 2 g L⁻¹ DAS i 2 g L⁻¹ DAP, dok je podloga (3) sadržavala : 20 g L⁻¹ glukoze, 10 g L⁻¹ ksiloze,

5 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta, 2 g L⁻¹ DAS i 2 g L⁻¹ DAP. Podloge su sterilizirane u autoklavu pri 121°C tijekom 15 min.

3.1.3.5. Hranjive podloge za uzgoj plijesni M. indicus DSM 2185 s različitim izvorima dušika

Hranjive podloge korištene za uzgoj plijesni *M. indicus* s ciljem ispitivanja optimalnog izvora dušika s obzirom na proizvodnju biomase i etanola sadržavale su 20 g L⁻¹ glukoze te različite koncentracije jednog od izvora dušika i to 1 g L⁻¹, 2 g L⁻¹, 4 g L⁻¹, 5 g L⁻¹, 7 g L⁻¹, 9 g L⁻¹ i 10 g L⁻¹. Izvori dušika bili su DAS, DAP, kukuruzna močevina (CSL), mesni ekstrakt, pepton i kvašćev ekstrakt. Podloge su pripremljene u Erlenmeyerovim tikvicama, pH je podešen na vrijednost od 5,5, a volumen medija bio je 230 mL. Podloge su sterilizirane u autoklavu pri 121°C tijekom 15 min.

3.1.3.6. Hranjive podloge za uzgoj plijesni M. indicus DSM 2185 na blago kiselom hidrolizatu kukuruznih oklasaka (BKHKO) i različitim izvorima dušika

Nakon odabira izvora dušika provedeni su uzgoji plijesni *M. indicus* na hidrolizatu kukuruznih oklasaka dobivenom kiselinskom predobradom u visokotlačnom reaktoru (Poglavlje 3.2.1.) s dodatkom 1 g L⁻¹, 5 g L⁻¹ ili 10 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta ili CSL-a. Potom su uzgoji provedeni na BKHKO koji je prethodno tretiran aktivnim ugljenom kako je opisano u poglavlju 3.2.4.5. uz 1 g L⁻¹, 5 g L⁻¹ ili 10 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta ili CSL-a. Podloge su pripremljene u Erlenmeyerovim tikvicama, pH vrijednost podloge bila je 5,5, a volumen medija bio je 230 mL. Podloge su sterilizirane u autoklavu pri 121°C tijekom 15 min.

3.1.3.7. Tekući ostatak hranjive podloge (TOHP) za uzgoj bakterije R. adriaticum DSM 2781

Kao hranjiva podloga za uzgoj bakterije *R. adriaticum* korišteni su TOHP dobiveni centrifugiranjem nakon uzgoja *M. indicus*. Nakon centrifugiranja, supernatant je odvojen od taloga dekantiranjem te je steriliziran u autoklavu pri 121°C tijekom 15 min. Nakon hlađenja, podlogama je u aseptičnim uvjetima dodano 10 mL prethodno pripremljene otopine soli i vitamina (Poglavlje 3.1.3.1.).

3.1.3.8. Hranjiva podloga za uzgoj plijesni M. indicus DSM 2185 u Erlenmeyerovim tikvicama i u bioreaktoru s mješalom tehnikom simultane enzimske saharifikacije i fermentacije

Za uzgoj *M. indicus* u Erlenmeyer tikvicama procesom simultane enzimske saharifikacije i fermentacije kao izvor ugljika korišteni PKO u koncentraciji od 40 g L⁻¹. Uzgoj se provodio na dvije različite podloge. Jedna podloga sadržavala je acetatni pufer pH vrijednosti 5,0 (Poglavlje 3.2.2.2.), a druga matričnu hranjivu podlogu (MHP) (Poglavlje 3.2.2.3.). Za uzgoj u bioreaktoru koristila se MHP čiji je sastav opisan u poglavlju 3.1.2.2. Uzgoj se provodio u bioreaktoru s miješalom volumena 1,5 L. pH podloge podešen je na 5,0. Nakon pripreme podloge, bioreaktor je nadopunjen demineraliziranom vodom do konačnog volumena, te steriliziran u autoklavu pri 121°C tijekom 15 min.

3.1.3.9. Hranjive podloge za uzgoj plijesni M. indicus DSM 2185 u većem mjerilu korištenjem različitih tipova bioreaktora

Za uzgoj plijesni *M. indicus* u većem mjerilu, u bioreaktoru s mješalom, barbotirajućoj koloni i horizontalnom cijevnom rotirajućem bioreaktoru (HRCB), korištene su dvije različite podloge. Podloga (1) sadržavala je BKHKO (Poglavlje 3.2.1.) uz dodatak 5 g L⁻¹ CSL-a, dok je podloga (2) pripremljena nakon odvojene enzimske hidrolize čvrste faze dobivene nakon blago kiselinske predobrade kukuruznih oklasaka (E-PKO) (Poglavlje 3.2.2.1.) uz dodatak 5 g L⁻¹ CSL-a. Podloge su prije inokulacije sterilizirane u bioreaktorima pri 121°C tijekom 15 min.

3.1.4. Aparatura i pribor

3.1.4.1. Mlin čekićar

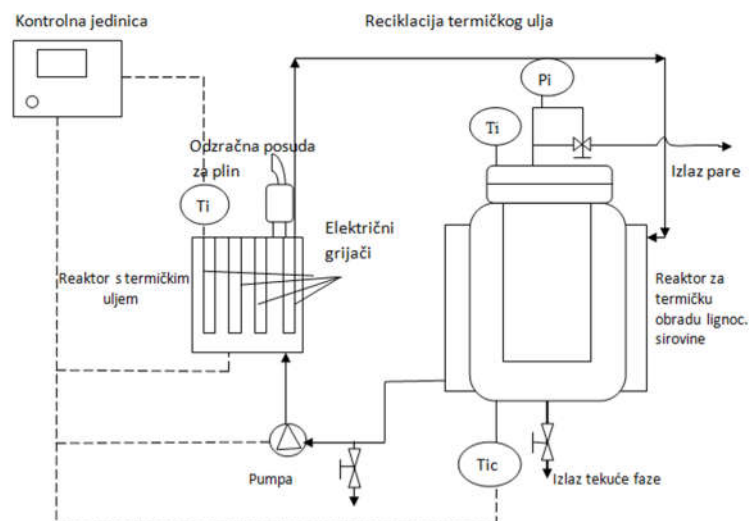
Za usitnjavanje lignocelulozne sirovine korišten je mlin čekićar tip NA45 (Slika 5.). Kapacitet mljevenja mlina u zrnju iznosi 300 kg h^{-1} , a za mljevenje u klipu 250 kg h^{-1} . Mlin pokreće trofazni motor, a sadrži dvije vrste sita različitih veličina, 12 i 5 mm. Za usitnjavanje lignoceluloznih sirovina korištenih u ovom radu primijenjeno je sito veličine 5 mm.



Slika 5. Mlin čekićar-tip NA45 (Megamet d.o.o., Nedelišće, Hrvatska).

3.1.4.2. Visokotlačni reaktor za termičku obradu lignoceluloznih sirovina

Za obradu lignocelulozne sirovine sa sumpornom kiselinom koristio se visokotlačni reaktor prikazan na Slici 6. U reaktoru ukupnog volumena 20 litara nalazi se perforirana košara u koju se stavlja lignocelulozna sirovina. Reaktor se grije preko plašta kroz koji struji termičko ulje koje se grije u odvojenoj posudi uz pomoć tri električna grijača. Integrirana pumpa omogućava strujanje zagrijanog ulja kroz cijeli sustav uz jednolično zagrijavanje smjese preko plašta reaktora. Reaktor sadrži temperaturne sonde za određivanje temperature ulja za grijanje, te temperaturne sonde za određivanje temperature u gornjem i donjem dijelu reaktora i tlaka u gornjem dijelu reaktora (tlak para). Nakon završetka procesa postepeno se ispušta para iz reaktora otvaranjem ventila za paru, a kada se tlak u reaktoru izjednači s atmosferskim tlakom otvara se ventil na dnu reaktora za ispuštanje tekućeg dijela hidrolizata. Čvrsti dio zaostaje u perforiranoj košari koja se može izvaditi nakon otvaranja poklopca reaktora.



Slika 6. Shema visokotlačnog reaktor za obradu lignoceluloznih sirovina (Ti- temp. pare/ulja; Pi-tlak pare u reaktoru; Tic- temperatura unutar reaktora).

3.1.4.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (Agilent Technologies 1290 Infinity II, Santa Clara, SAD) sastoji od: crpke (G7104A 1290 Flexible Pump), injektora (G7129B 1290 Vialsampler) i pećnice, analitičke kolone (Rezex ROA-Organic Acid H⁺, Phenomenex) dimenzija 150×7,8 mm s odgovarajućim pretkolonama, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID) i računalnog programa za kromatografiju (OpenLAB CDS). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina sumporne kiseline. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 10 µL, a protok mobilne faze 0,6 mL min⁻¹.

3.1.4.4. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC)

Koncentracija etanola i viših alkohola određena je u tekućoj fazi uzoraka izuzetih tijekom eksperimenata izrađivanja binodalnih krivulja s ravnotežnim linijama, konstrukcije baždarnih dijagrama, te tijekom procesa ekstrakcije. Nakon ekstrakcije etanola iz vodene u organsku fazu, određena je koncentracija pomoću plinsko-kromatografskog sustava Shimadzu GC 2010Plus AF (Shimadzu, Kyoto, Japan). Koncentracije i sastav estera masnih kiselina u biomasi plijesni *M. indicus* DSM 2185 također su određene pomoću ovog sustava. Sustav se sastoji od: automatskog uzorkivača (150 mjesta; AOC - 20s), injektora (AOC- 20i), peći, ZB-WAX plus (30 m×0,25 mm i.d., 0,25 µm df; Zebron, SAD) ili ZB-FAME (30 m×0,25 mm i.d. 0,2 µm df; Zebron, SAD), plamenoionizacijskog detektora (eng. Flame-Ionization Detector, FID) i programa za prikupljanje i obradu podataka GC Solutions verzija 2.32.

3.1.4.5. Spektrofotometri

Za određivanje optičke gustoće uzoraka tijekom uzgoja i snimanje apsorpcijskog spektra u rasponu valnih duljima od 200 do 900 nm korišten je spektrofotometar Cary 100, UV-VIS (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD), dok je za određivanje enzimске aktivnosti i koncentracije proteina po Bradfordu korišten spektrofotometar Lambda 35 UV/VIS (Perkin Elmer, SAD). Mjerenja su izvršena u staklenim kivetama širine 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) ili jednokratnim semi-mikro plastičnim kivetama (Kartell, Noviglio, Italija). Za određivanje apsorpcijskog spektra ekstrahiranih pigmenata tijekom uzgoja korištena je kvarcna kiveta širine 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka).

3.1.4.6. Centrifuge

Za izdvajanje biomase plijesni i bakterija nakon uzgoja u bioreaktorima korištena je centrifuga Beckmann J-21B, a za izdvajanje biomase iz suspenzije nakon uzgoja u tikvicama korištena je centrifuga Thermo Scientific SL 8R (Thermo Fischer Scientific, SAD; 7000 min⁻¹/4°C/10 min). Za centrifugiranje manjih volumena korištena je centrifuga CF-10 (Witeg, Wertheim, Njemačka).

3.1.4.7. Bioreaktor s miješalom

Za uzgoj plijesni *M. indicus* i bakterije *R. adriaticum* korišten je bioreaktor s miješalom korisnog volumena 1,5 L (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Njemačka). Hranjiva podloga i bioreaktor sterilizirani su zajedno indirektno pomoću vodene pare. Bioreaktor je staklena posuda dimenzija 15 x 30 cm gdje se miješanje podloge provodi pomoću turbinskog miješala, a raspršivanje zraka preko prstenaste sapnice promjera 5 cm koja je udaljena 2 cm od dna bioreaktora. Protok kroz prstenastu sapnicu kontrolira se preko rotametra. Bioreaktor je povezan s komandnom pločom za automatsku regulaciju temperature te pH vrijednosti. Otvori preko kojih se provela inokulacija te iz kojih su se periodično uzimali uzorci za analizu nalaze se na gornjoj podnici bioreaktora zajedno s filterom za aeraciju podloge.

3.1.4.8. Barbotirajuća kolona

Barbotirajuća kolona je stakleni bioreaktor (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Njemačka) dimenzija 15 x 30 cm gdje se izmješavanje podloge provodi sa zrakom preko prstenaste sapnice promjera 5 cm koja je udaljena 2 cm od dna bioreaktora. Protok kroz prstenastu sapnicu kontrolira se preko rotametra. Barbotirajuća kolona je povezana

s komandnom pločom (Biostat MD, B. Braun Biotech International, Njemačka) preko koje se provodi automatska regulacija temperature te pH vrijednosti.

3.1.4.9. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB)

HRCB se sastoji od nosača, bioreaktora izrađenog od nehrđajućeg čelika, elektromotora i kontrolne jedinice. Nosač bioreaktora podupire posudu bioreaktora čime omogućava njenu rotaciju preko osovine koju pokreće elektromotor. Kontrolna jedinica omogućuje regulaciju broja okretaja bioreaktora i intervalno uključivanje/isključivanje rotacije. Bioreaktor se rotira pomoću elektromotora snage 0,9 kW. Maksimalni broj okretaja HRCB-a iznosi 60 min^{-1} . Opisani bioreaktor nema regulaciju temperature i pH vrijednosti, a ukupni volumen iznosi 30 L. Bioreaktor ima ugrađena dva lopatasta miješala duljine 0,6 m i širine 0,04 m učvršćena na unutrašnju stijenku HRCB-a. Sterilizacija se provodi direktnom parom. Bioreaktor ima dva mjesta za izuzimanje uzoraka: za izuzimanje tekuće faze i za izuzimanje čvrste faze (Slika 7).



Slika 7. Horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor (HRCB).

3.1.4.10. Oprema za istraživanje kontinuirane ekstrakcije

Za ekstrakciju etanola iz vodene otopine korištena je posuda s miješalom, korisnog volumena 1,5 L, peristaltička pumpa Ismatec MCP V5.17 (Zürich, Švicarska), te staklena kolona za razdvajanje faza ($H = 1,25$ m, $r = 0,025$ m, $V = 2$ L). Uređaj za testiranje ekstrakcije prikazan je na Slici 8.



Slika 8. Uređaj za ekstrakciju etanola iz hranjive podloge.

3.1.4.11. Ostala korištena oprema

Uređaj	Proizvođač
Tresilica	RM 71 B. Braun Biotech. International,
	Satorius Group, Njemačka
Sušionik	Instrumenaria ST-50, Hrvatska
Tehnička vaga	Tehnica ET - 1111, Slovenija
Analitička vaga	Shimadzu, AX-200 W/O AC ECTA, Japan
Oprema za filtraciju otopina	Najlonski filteri (0,20 μm , 47 mm); Magna, GE Water i Process Technologies, Michigan, SAD
	Filteri CHROMAFIL Xtra PA-20/25, Njemačka
Magnetska miješalica	Tehnica ET - 1111, Slovenija
Autoklav	Sutjeska, Beograd, Jugoslavija
Hladnjak i zamrzivač	Bosch, Njemačka
pH metar 744	Metrohm, Švicarska
Modul sa šupljim vlaknima Microza UF modul SLP-1053, 10 kDa cut-off,	Pall Corporation, SAD
Uređaj za elektroforezu Mini PROTEAN Tetra Cell i PowerPac HC	Bio-Rad, Hercules, SAD
Universal Hood II Gel Doc sustav	Bio-Rad, Hercules, SAD

3.1.4.12. Programski paketi

U izradi ovog rada korišteni su sljedeći programski paketi:

1) Programski paket Sigma Plot i Microsoft Office Excel

Programski paket Sigma Plot verzija 11.0 (Systat Software Inc., SAD) i Microsoft Office Excel 365 (Microsoft, SAD) korišteni su za statističku analizu podataka te crtanje grafova.

2) Programski paket Design Expert

Programski paket Design Expert verzija 11.0 (State-Ease, SAD) korišten je za izračunavanje i prilagođavanje nezavisnih varijabli predloženog modela plana istraživanja.

3.2. Metode

3.2.1. Fizikalno-kemijska predobrada lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom

3.2.1.1. Analiza sastava lignoceluloznih sirovina

Sastav lignoceluloznih sirovina (pšenična slama, otpadna trava, kukuruzovina i kukuruzni oklasci) određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (Poglavlje 3.3.1.), a udio lignina određen je nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Postupak dvostupanjske kiselinske hidrolize opisan je u poglavlju 3.2.1.3..

3.2.1.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina

Kiselinska predobrada prethodno usitnjenih lignoceluloznih sirovina (pšenična slama, otpadna trava, kukuruzovina i kukuruzni oklasci) s razrijeđenom sumpornom kiselinom provedena je u visokotlačnom reaktoru. U reaktoru je pomiješano 500 g suhe tvari sirovine s 10 litara 0,5%-tne otopine sumporne kiseline koja je pripremljena dodatkom 28,75 mL 96% H_2SO_4 u 9,971 L vodovodne vode. Početni omjer tekućeg dijela (otopina sumporne kiseline) i čvrstog dijela (lignocelulozne sirovine) bio je 1:20 (g mL^{-1}). Predobrade su provedene pri temperaturama 160 °C, 180 °C i 200 °C uz vremena zadržavanja 1, 5 i 10 min. Nakon postizanja željene temperature predobrade i isteka ispitivanog vremena zadržavanja, iz reaktora je ispuštena para. Tekuća faza je ispuštena kroz ventil na dnu posude reaktora nakon čega joj je izmjeren volumen te je analizirana kako je opisano u poglavljima 3.2.1.3.-3.2.1.6. Tekući dio je neutraliziran do neutralnog pH dodatkom kalcijevog hidroksida i kao takav je korišten za kultivacije. Čvrsta faza hidrolizata zaostala je u perforiranoj unutarnjoj posudi reaktora. U čvrstom dijelu hidrolizata određen je udjel suhe tvari gravimetrijski tj. sušenjem na 60°C do konstantne mase. Osušeni čvrsti dio hidrolizata je čuvan u suhoj i tamnoj prostoriji na sobnoj temperaturi. U čvrstom dijelu hidrolizata pšenične slame određen je udio ksilana, glukana, arabinana (Poglavlje 3.3.1.) i lignina topivog (LTK) i netopivog (LNTK) u kiselini nakon provedene dvostupanjske kiselinske hidrolize (Poglavlje 3.2.1.3.-3.2.1.5.).

3.2.1.3. Dvostupanjska kiselinska hidroliza

Dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom analiziran je sastav sirovina i predobrađenih sirovina koje su korištene u ovom radu. Postupak je proveden zbog određivanja koncentracije ugljikohidrata i lignina topivog i netopivog u kiselini.

U tikvicu s okruglim dnom dodano je 0,4 g uzorka i 4 mL 72%-tne H₂SO₄. Sadržaj je inkubiran jedan sat na temperaturi od 30°C, zatim je dodano 111 mL demineralizirane vode te su uzorci kuhani 4 sata uz povratno hladilo. Sadržaj u tikvici je povremeno miješan protresanjem tikvice kako bi se ostvario što bolji kontakt sirovine i kiseline i kako bi se smanjili gubici uslijed hvatanja sirovine za stijenke tikvice. Nakon kuhanja, uzorak je ohlađen pod mlazom vode te profiltriran kroz celulozni filter papir preko Büchnerovog lijevaka. Iz čvrstog dijela sirovine zaostalog na filter papiru određen je lignin netopljiv u kiselini, a u filtratu je određena koncentracija topivog lignina i ukupnih furana (HMF i furfural) (Poglavlje 3.2.1.4.-3.2.1.6.) te je određena koncentracija šećera i drugih komponenti UPLC metodom (Poglavlje 3.3.1.).

3.2.1.4. Određivanje udjela netopivog lignina

Isprani čvrsti dio nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize prebačen je u osušenu i izvaganu Petrijevu zdjelicu te je stavljen na sušenje na temperaturu od 105°C kroz 24 h. Nakon sušenja uzorak je ponovno izvagan te je određen udio netopivog lignina prema formuli 2.

$$w(LNTK) = \frac{m(\text{osušeni filter s talogom}) - m(\text{filtera})}{m(\text{uzorak čvrste faze uzetog za analizu})} \quad [2]$$

3.2.1.5. Određivanje udjela topivog lignina

Udio topivog lignina određen je u filtratu nakon dvostupanjske hidrolize mjerenjem apsorbancije spektrofotometrom pri valnoj duljini od 205 nm. Uzorak je razrijeđen demineraliziranom vodom kako bi apsorbancija iznosila između 0,7 i 1 te je udio lignina topivog u kiselini izračunat prema formuli 3.

$$w(LTK) = \frac{A \cdot D \cdot V}{a \cdot b \cdot m} * 100 \quad [3]$$

A = apsorbancija uzorka na 205 nm; D = faktor razrjeđenja; V = volumen filtrata (mL); a = konstanta, 110 g L⁻¹cm⁻¹; m = masa uzorka uzetog za analizu (g)

3.2.1.6. Određivanje ukupnih furana

Ukupni furani određeni su u filtratu nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize. Uzorak je razrijeđen u omjeru 1:1000 te su izmjerene apsorbancije spektrofotometrom pri 284 nm i 320 nm. Koncentracija je izračunata prema jednadžbi baždarnog pravca: $\gamma_{\text{furani}} = 2,496 \cdot \Delta A + 0,0158$; R² = 0,998.

3.2.2. Biološki postupak obrade predobrađenih otpadnih lignoceluloznih sirovina

3.2.2.1. Enzimska hidroliza kukuruznih oklasaka pomoću komercijalnih enzima

Enzimska hidroliza usitnjenih i osušenih predobrađenih kukuruznih oklasaka provedena je pomoću komercijalnih enzima Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend. Postupak enzimske hidrolize proveden je u ukupnom volumenu od 50 mL. U Erlenmeyerovu tikvicu odvagana je odgovarajuća količina PKO (10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} , 40 g L^{-1}) te je dodan acetatni pufer (pH 5,0). Tikvice su zatvorene vatenim čepom i sterilizirane. Nakon hlađenja u tikvice je dodano 1% (vol vol⁻¹), 10% (vol vol⁻¹) ili 20% (vol vol⁻¹) pojedinog enzimskog pripravka. Dodatak enzima u sterilnu suspenziju kukuruznih oklasaka i izuzimanje uzoraka za daljnju analizu provedeno je u sterilnim uvjetima. Uzorci su analizirani pomoću UPLC metode (Poglavlje 3.3.1.).

Kako bi se odredili optimalni uvjeti enzimske hidrolize PKO provedeni su eksperimenti u kojima je istražen utjecaj koncentracije dodanog enzima (Viscozyme L, Cellulase, enzyme blend i kombinacije navedenih enzima) i supstrata (Tablica 7, Tablica 8). Svi eksperimenti provedeni su na temperaturi od 50°C, u acetatnom puferu pH 5,0 na magnetnoj miješalici. Uzorci su izuzimani u periodičnim intervalima te analizirani pomoću UPLC metode (Poglavlje 3.3.1.).

Tablica 7. Koncentracije enzima i supstrata korištenih za enzimsku hidrolizu PKO pomoću Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend (T=50°C; pH 5,0)

Enzim (%vol vol ⁻¹)	Supstrat (g L ⁻¹)
1	10
	20
	40
10	10
	20
	40
20	10
	20
	40

Vis – Viscozyme L; CB – Cellulase, enzyme blend

Tablica 8. Koncentracije enzima i supstrata korištenih za enzimsku hidrolizu PKO uz mješavinu enzima (T=50°C; pH 5,0)

Enzim (% vol vol ⁻¹)		Supstrat (g L ⁻¹)
CB	Vis	
1	1	10
		20
		40
2	5	10
		20
		40
5	10	10
		20
		40

Vis – Viscozyme L; CB – Cellulase, enzyme blend

3.2.2.2. Enzimska hidroliza kukuruznih oklasaka pomoću komercijalnih enzima pri različitim temperaturama

Predobrađeni i usitnjeni kukuruzni oklasci podvrgnuti su enzimskoj hidrolizi u 6 tikvica. Koncentracija suhe tvari sirovine u svakoj tikvici iznosila je 40 g L⁻¹. Tri tikvice su uz

sirovinu sadržavale 50 mL acetatnog pufera, a preostale tri 50 mL MHP. Za hidrolizu je korištena kombinacija komercijalnih enzima Viscozyme (5,18 % vol vol⁻¹) i Cellulase, enzyme blend (2% vol vol⁻¹). Reakcija se provodila kroz 48 h na različitim temperaturama (20°C, 30°C, 40°C i 50°C) uz miješanje na magnetnoj miješalici pri 160 o min⁻¹. Uzorci su analizirani pomoću UPLC metode (Poglavlje 3.3.1.).

3.2.2.3. Priprema acetatnog pufera

Za pripremu acetatnog pufera korištene su 0,2 M otopina octene kiseline (otopina A) i otopina natrijeva acetata trihidrata ($C_2H_3O_2Na \times 3H_2O$; otopina B). Otopina A pripremljena je dodavanjem 5,78 mL octene kiseline u 0,5 L demineralizirane vode. Otopina B pripremljena je dodavanjem 13,6 g natrijeva acetata trihidrata u 0,5 L demineralizirane vode. Acetatni pufer je pripremljen u Erlenmayer tikvici od 250 mL dodatkom 74 mL otopine A i 176 mL otopine B, konačne pH vrijednosti 5,0.

3.2.2.4. Priprema matrične hranjive podloge (MHP)

Za pripremu MHP, koja simulira stvarnu podlogu, korištene su sljedeće kemikalije: 5 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta, 2 g L⁻¹ diamonijeva fosfata, 2 g L⁻¹ diamonijeva sulfata i 40 g L⁻¹ kemijski predobrađenih, usitnjenih i ispranih kukuruznih oklasaka kao supstrata. pH podloge podesi se na 5,0. U procesu enzimske hidrolize ukupni volumen u tikvicama bio je 50 mL.

3.2.3. Uzgoj odabranih vrsta plijesni za procjenu lignocelulolitičke aktivnosti i proizvodnju lignocelulolitičkih enzima

3.2.3.1. Kultivacija predkultura za indukciju proizvodnje lignocelulolitičkih enzima

Predkultura svih sedam plijesni (MI, PV, MT, TT, BD, FO i FV) pokrenuta je kao fermentacija na čvrstom supstratu, koristeći suhi PKO kao čvrsti supstrat. Supstrat je navlažen dodavanjem 20 mL sterilizirane hranjive podloge (Poglavlje 3.1.3.3.) u tikvicu od 500 mL koja je sadržavala 5 g PKO. U medij je dodana suspenzija spora svake plijesni (broj određen u Thoma-ovoj komorici) koja je rezultirala koncentracijom od 10⁶ spora po gramu suhog supstrata. Kultivacije su provedene na 30°C tijekom 24 h u statičkim uvjetima. Nakon tog vremenskog razdoblja, 200 mL svakog odgovarajućeg hranjivog medija prikazanog u Tablici 1, obogaćenog s 30 g L⁻¹ glukoze, dodano je u analogne tikvice i uzgoj je nastavljen kao submerzna kultivacija na 30°C tijekom 48 h uz kontinuirano miješanje na 180 o min⁻¹. Volumen svake suspenzije predkulture (MI, PV, MT, TT, BD, FO i FV) koji odgovara 10%

(vol vol⁻¹) korišten je za pokretanje proizvodnje lignocelulolitičkih enzima. U slučaju uzgoja miješane kulture (FO i FV) dodano je 5% (vol vol⁻¹) svake predkulture soja.

3.2.3.2. Kombinirana redosljedna fermentacija čvrstog supstrata i submerzna fermentacija u svrhu proizvodnje lignocelulolitičkih enzima

Mediji korišteni za proizvodnju enzima bili su slični onima korištenim za predkulture (Poglavlje 3.1.3.3.), uz izuzetak dodatka 10 g L⁻¹ glukoze i 2% (m vol⁻¹) suhih PKO.

Procjena utjecaja sastava medija na proizvodnju enzima izvršena je u manjem mjerilu. Preliminarne kultivacije vođene su tijekom 96 h u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL, radnog volumena 100 mL, pri 30°C i 180 o min⁻¹. pH podloge je postavljen na 6,0 te je praćen i korigiran na dnevnoj bazi. Uzorci su sakupljeni nakon 96 h, centrifugirani na 6000 g tijekom 10 min. Sirovi enzimski ekstrakti korišteni su za kvantificiranje aktivnosti celulolitičkih enzima i redukcijskih šećera (Poglavlje 3.3.2-3.3.5.), te koncentracije ukupnih proteina (Poglavlje 3.3.6.). Dobiveni rezultati su analizirani i za daljnje eksperimente su odabrane plijesni i medij s najvećom enzimskom aktivnošću.

Kultivacije provedene u Erlenmeyerovim tikvicama od 1 L, s 500 mL medija, provedene su tijekom 14 dana na 30°C i 200 o min⁻¹. Uzorci su sakupljeni u intervalima od 24 h, te su centrifugirani na 6000 g kroz 10 min. Sirovi enzimski ekstrakt korišten je za kvantificiranje aktivnosti endoglukanaza, egzoglukanaza i ksilanaza (Poglavlje 3.3.2.) i određivanje koncentracije ukupnih proteina (Poglavlje 3.3.6.), kao i za određivanje koncentracije šećera. Rezultati su pokazali da je aktivnost enzima najveća nakon 6 dana, pa su uzgoji ponovljeni i prekinuti nakon 6 dana. Podloga je centrifugirana (6000 × g; 10 min), a dobiveni sirovi ekstrakt korišten je za daljnje pročišćavanje i karakterizaciju proteina.

3.2.3.3. Pročišćavanje proteina

Dijafiltracija je korištena za uklanjanje soli i malih molekula iz supernatanta dobivenog nakon uzgoja odabranih plijesni. Supernatant je pročišćen, koncentriran i zamijenjen acetatnim puferom (pH vrijednosti 6) korištenjem modula s poroznim vlaknima. Uzorci su pohranjeni na 4°C, a kasnije su korišteni za određivanje enzimске aktivnosti i ukupnih proteina (Poglavlje 3.3.2.-3.3.6.) te SDS-PAGE (Poglavlje 3.3.7.).

3.2.4. Uzgoj odabranih vrsta mikroorganizama (kvasca *S. cerevisiae* Y9, plijesni *M. indicus* DSM 2185 i bakterije *R. adriaticum* DSM 2781) u svrhu optimizacije proizvodnje biogoriva i biokemikalija

*3.2.4.1. Uzgoj inokuluma kvasca *S. cerevisiae* Y9 i plijesni *M. indicus* DSM 2185*

Kultura kvasca *S. cerevisiae* Y9 uzgojena je na podlozi pripremljenoj na način opisan u poglavlju 3.1.3.2.. U epruvetu s kosom podlogom na kojoj je uzgojena kultura kvasaca dodano je 10 mL vode, te je kultura sastrugana s površine podloge pomoću mikrobiološke ušice. Suspenzija iz epruvete zatim je dodana u 250 mL hranjive podloge za uzgoj inokuluma u Erlenmeyer tikvici od 500 mL. Inokulum je uzgajan na tresilici pri 140 okretaja po minuti i temperaturi od 30°C tijekom 24 h.

S čvrste podloge na kojoj je uzgojena kultura plijesni spore su ostrugane štapićem po Drigalskom nakon dodatka otopine Tween 80. Pipetmanom je dio podloge zajedno sa sporama u aseptičnim uvjetima prenešen u tikvicu sa 250 mL hranjive podloge za uzgoj inokuluma (Poglavljje 3.1.3.2.). Inokulum je uzgajan na tresilici pri 140 okretaja po minuti, pri temperaturi 30°C tijekom 48 h.

*3.2.4.2. Uzgoj inokuluma bakterije *R. adriaticum* DSM 2781*

Sastav hranjive podloge za inokulum je prethodno opisan u poglavlju 3.1.3.7. Podloga je sterilizirana, a termosenzibilni sastojci dodani su nakon sterilizacije i hlađenja preko filtera promjera pora 0,2 µm. Uzgoji su se provodili u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL, a ukupni volumen hranjive podloge bio je 250 mL. Uzgoj inokuluma je proveden u mikroaerofilnim uvjetima tijekom 48 h pri temperaturi od 30°C, 2000 lux ispod obične žarulje, u tikvicama s brušenim čepom.

*3.2.4.3. Uzgoj kvasca *S. cerevisiae* Y9 i plijesni *M. indicus* DSM 2185 u svrhu optimizacije proizvodnje biogoriva i biokemikalija*

Podloge korištene za proizvodnju etanola pomoću kvasca *S. cerevisiae* Y9 i plijesni *M. indicus* u tikvicama su pripremljene na način opisan u poglavlju 3.1.3.4. Uzgoji su se provodili u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL, a ukupni volumen hranjive podloge bio je 230 mL. U svaku hranjivu podlogu sterilno je dodano 20 mL inokuluma prethodno uzgojenog na podlozi za uzgoj inokuluma (Poglavljje 3.1.3.2.). Tikvice za uzgoj u aerobnim uvjetima stavljene su tresilicu na 200 o min⁻¹ i 30°C, dok je na svaku tikvicu za uzgoj u anaerobnim uvjetima stavljena vreljnjača koja je prethodno dezinficirana pomoću etanola i provlačenja kroz plamen.

Uzgoj u anaerobnim uvjetima izvršen je u statičkim uvjetima i na 30°C. Oba procesa praćena su kroz 24 h, odnosno 48 h. Uzorci su izuzimani u periodičnim intervalima i analizirani UPLC metodom (Poglavlje 3.3.1.).

*3.2.4.4. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na podlogama s različitim izvorima dušika te glukozom kao izvorom ugljika u aerobnim uvjetima*

Ovi su uzgoji provedeni tako da je 230 mL sterilne definirane podloge s glukozom i jednim izvorom dušika (Poglavlje 3.1.3.5.) naciepljeno s 20 mL inokuluma plijesni *M. indicus*. Uzgoji su provedeni u Erlenmeyer tikvicama volumena 500 mL. Kao izvor dušika su korišteni diamonijev sulfat, diamonijev fosfat, pepton, mesni ekstrakt, CSL i kvašćev ekstrakt. Uzgoji su provedeni na tresilici uz 200 o min⁻¹, na temperaturi od 30°C, te su trajali 48 h. Periodično su izuzimani uzorci iz svake tikvice za analizu UPLC metodom (Poglavlje 3.3.1.). Na kraju uzgoja sadržaj tikvica je centrifugiran te je biomasa osušena i izvagana radi određivanja konačne koncentracije biomase (Poglavlje 3.3.9.) i izolacije masnih kiselina (Poglavlje 3.3.10.).

*3.2.4.5. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na hidrolizatu kukuruznih oklasaka i različitim izvorima dušika*

Uzgoji plijesni *M. indicus* su provedeni u Erlenmeyer tikvicama volumena 500 mL, dok su volumeni podloga bili 230 mL. Za hranjive podloge je u ovom poglavlju korišten hidrolizat kukuruznih oklasaka čiji je sastav naveden u Tablici 1 uz dodatak CSL-a ili kvašćevog ekstrakta. Podloge su naciepljene s po 20 mL inokuluma plijesni pripremljenog na način opisan u poglavlju 3.1.3.2.. Uzgoji su provedeni na tresilici pri brzini okretaja 200 o min⁻¹ na 30°C. Ukupno vrijeme trajanja ovih uzgoja je 48 h, a uzorci za analizu UPLC metodom (Poglavlje 3.3.1.) su uzeti u periodičnim intervalima. Na kraju uzgoja sadržaj tikvica je centrifugiran te je biomasa osušena i izvagana radi određivanja konačne koncentracije biomase (Poglavlje 3.3.9.) i radi izolacije masnih kiselina (Poglavlje 3.3.10.).

Hidrolizat kukuruznih oklasaka je prije sterilizacije tretiran aktivnim ugljenom s ciljem detoksifikacije odnosno uklanjanja inhibitorna rasta i fermentacije. Hidrolizatu iz poglavlja 3.1.2. je dodano 25 g L⁻¹ aktivnog ugljena te je ostavljen na tresilici pri 200 o min⁻¹, na 30°C kroz 1 h. Hidrolizat s aktivnim ugljenom je potom filtriran pomoću Büchnerovog lijevka, a zatim steriliziran, ohlađen i korišten za uzgoj *M. indicus* na prethodno opisan način.

3.2.4.6. Uzgoj bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 na TOHP dobivenim nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 na sirovom blago kiselom hidrolizatu kukuruznih oklasaka (SBKHKO) i dekoloriziranom blago kiselom hidrolizatu kukuruznih oklasaka (DBKHKO)

Kao hranjiva podloga za uzgoj bakterije *R. adriaticum* korištene su TOHP dobivene uklanjanjem biomase plijesni *M. indicus* iz fermentiranih podloga (Poglavlje 3.2.4.5.). Nakon centrifugiranja, supernatant je odvojen od taloga dekantiranjem te je steriliziran u autoklavu. Nakon hlađenja, podlogama je u aseptičnim uvjetima dodano 10 mL prethodno pripremljene otopine soli i vitamina te 15 mL inokuluma bakterije *R. adriaticum* pripremljenog na način opisan u poglavlju 3.1.3.7.. Uzgoji su provedeni na svjetlu jakosti 2000 lux, pri 30°C u mikroaerofilnim uvjetima u Erlenmeyer tikvicama volumena 500 mL. Uzgoji su trajali 168 h, a svakih 24 h uziman je uzorak za analizu UPLC metodom (Poglavlje 3.3.1.) i određivanje optičke gustoće (Poglavlje 3.3.11). Na kraju uzgoja sadržaj tikvica je odcentrifugiran te je biomasa osušena i izvagana radi određivanja konačne koncentracije biomase (Poglavlje 3.3.9.) i izolacije pigmenata (Poglavlje 3.3.12.).

3.2.4.7. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 simultanom saharifikacijom i fermentacijom na PKO

Čvrsti dio dobiven nakon predobrade kukuruznih oklasaka korišten je kao izvor ugljika za uzgoj plijesni *M. indicus* procesom simultane saharifikacije i fermentacije. Uzgoj je proveden u Erlenmayer tikvicama na tresilici (200 o min⁻¹) kroz 48 h pri različitim temperaturama (20°C, 30°C i 40°C) i medijima (acetatni pufer ili matrica (Poglavlje 3.2.2.2.-3.2.2.3.)). Korištene su tikvice volumena 500 mL u kojima je ukupni volumen podloge iznosio 250 mL (Poglavlje 3.2.2.2..). Tikvice su naciepljene s kulturom plijesni *M. indicus* volumena 20 mL. Osim inokuluma, u tikvice je dodano i 2% vol vol⁻¹ enzima Cellulase, enzyme blend i 5% vol vol⁻¹ Viscozyme L. Tijekom uzgoja, uzorci su izuzimani u periodičnim intervalima i pripremljeni za analizu UPLC metodom (Poglavlje 3.3.1.).

3.2.5. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 u većem mjerilu korištenjem različitih izvedbi bioreaktora

3.2.5.1. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom

Za uzgoj plijesni *Mucor indicus* u većem mjerilu korišten je bioreaktor s miješalom iz poglavlja 3.1.4.7. Kao hranjiva podloga je korišten BKHKO (Poglavlje 3.1.2.) i E-PKO (Poglavlje 3.2.2.1.) uz dodatak 5 g L⁻¹ CSL-a kao pomoćnim izvorom dušika. Hranjiva podloga

i bioreaktor sterilizirani su zajedno, indirektno pomoću vodene pare na 121°C kroz 30 min. Ukupni volumen hranjive podloge bio je 1,5 L, a volumen inokuluma iznosio je 8% (vol vol⁻¹). Uzgoj se provodio 48 h pri 30°C, u aerobnim uvjetima uz protok zraka od 1 L min⁻¹, broj okretaja miješala 50 o min⁻¹ i bez korekcije pH vrijednosti podloge. Pjenjenje je održavano dodatkom protupjenika. Uzorci podloge za analizu UPLC-om (Poglavljje 3.3.1.) uzimani su u periodičnim intervalima. Na kraju uzgoja cijeli sadržaj bioreaktora je centrifugiran te je biomasa osušena i izvagana radi određivanja konačne koncentracije biomase (Poglavljje 3.3.9.) i radi izolacije hitina i hitozana (Poglavljje 3.2.6.7.).

3.2.5.2. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 u barbotirajućoj koloni

U barbotirajućoj koloni (Poglavljje 3.1.4.8.) kao hranjive podloge korišteni su BKHKO (Poglavljje 3.1.2.) i E-PKO (Poglavljje 3.2.2.1.) uz dodatak 5 g L⁻¹ CSL-a. Hranjiva podloga i bioreaktor sterilizirani su zajedno, indirektno pomoću vodene pare na 121°C kroz 30 min. Ukupni volumen hranjive podloge bio je 1,5 L, a volumen inokuluma iznosio je 8% (vol vol⁻¹). Uzgoj je vođen uz aeraciju od 2,0 L min⁻¹ što je omogućilo i miješanje sadržaja u bioreaktoru. Temperatura je održavana na 30°C, pH vrijednost podloge tijekom uzgoja nije korigirana, a pjenjenje je održavano dodatkom protupjenika. Uzorci su izuzimani tijekom 48 h i analizirani UPLC metodom opisanom u poglavlju 3.3.1. Na kraju uzgoja cijeli sadržaj bioreaktora je centrifugiran te je biomasa osušena i izvagana radi određivanja konačne koncentracije biomase (Poglavljje 3.3.9.) i radi izolacije hitina i hitozana (Poglavljje 3.2.6.7.).

3.2.5.3. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreaktoru

U HRCB (Poglavljje 3.1.4.9.) dodane su 3,7 L BKHKO (Poglavljje 3.1.2.) i E-PKO (Poglavljje 3.2.2.1.) obogaćenih sa 5 g L⁻¹ CSL-a (Poglavljje 3.3.10.) u aseptičnim uvjetima. Podloge su inokulirane sa 8% vol vol⁻¹ prethodno pripremljene suspenzije plijesni *M. indicus*. Uzgoj je vođen bez aeracije uz rotaciju bioreaktora od 20 min⁻¹. pH tijekom uzgoja nije korigiran, a uzorci su izuzimani tijekom 144 h odnosno 72 h te analizirani UPLC metodom (Poglavljje 3.3.1.). Na kraju uzgoja cijeli sadržaj bioreaktora je centrifugiran te je biomasa osušena i izvagana radi određivanja konačne koncentracije biomase (Poglavljje 3.3.9.) odnosno izolacije hitina i hitozana (Poglavljje 3.2.6.7.).

3.2.5.4. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 tijekom simultane saharifikacije i fermentacije u bioreaktoru s miješalom

Za uzgoj plijesni *M. indicus* i provedbu procesa simultane saharifikacije i fermentacije korišten je bioreaktor s miješalom (Poglavlje 3.1.4.7.). Hranjiva podloga (Poglavlje 3.1.2.2.) i bioreaktor sterilizirani su zajedno, indirektno pomoću vodene pare na 121°C kroz 30 min. Ukupni volumen hranjive podloge bio je 1,5 L, a inokulirana je s 8% vol vol⁻¹ suspenzije plijesni *M. indicus*. U podlogu je dodano i 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L. Uzgoj se provodio 48 h pri 30°C, u aerobnim uvjetima uz protok zraka od 2 L min⁻¹ i broj okretaja miješala 50 o min⁻¹. Pjenjenje je kontrolirano dodatkom protupjenika. Tijekom uzgoja, uzorci su izuzimani u periodičnim intervalima i pripremljeni za analizu UPLC metodom (Poglavlje 3.3.1.).

3.2.5.5. Uzgoj bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 na TOHP dobivenoj nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom

Uzgoj bakterije *R. adriaticum* u većem mjerilu proveden je u bioreaktoru s miješalom iz poglavlja 3.1.4.7. Nakon uzgoja plijesni *M. indicus* u bioreaktoru s miješalom na BKHKO (Poglavlje 3.2.5.1.) i odvajanja biomase plijesni centrifugiranjem, preostala je tekuća podloga volumena 1 L. Hranjivoj podlozi je dodano 15 mL otopine vitamina, 15 mL otopine elemenata u tragovima (Poglavlje 3.1.3.1.) te je podloga nacijepljena s 8% vol vol⁻¹ suspenzije bakterije *R. adriaticum* (Poglavlje 3.1.3.1.). Uzgoj je trajao 168 h pri 30°C, brzinom okretaja miješala od 50 o min⁻¹, bez aeracije uz kombinaciju crvenog i plavog svjetla. Uzorci za analiziranje su uzimani svakih 24 h za analizu UPLC metodom (Poglavlje 3.3.1.) i određivanje optičke gustoće (Poglavlje 3.3.11). Na kraju uzgoja cijeli sadržaj bioreaktora je centrifugiran te je biomasa osušena i izvagana radi određivanja konačne koncentracije biomase (Poglavlje 3.3.9.) odnosno izolacije pigmenata (Poglavlje 3.3.12.).

3.2.6. Izdvajanje i pročišćavanje biokemikalija dobivenih tijekom bioprocesa uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u različitim bioreaktorskim sustavima na podlogama dobivenim fizikalno-kemijskim i biološkim procesima obrade lignoceluloznih sirovina

3.2.6.1. Preliminarno istraživanje ponašanja trokomponentnih smjesa i izrada trokutnih trokomponentnih dijagrama

Homogenost trokomponentne smjese otapalo + etanol + voda ispitivana je u graduiranim epruvetama. U epruvete su otpipetirani voda i otapalo u omjerima 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 95:5 i 98:2. U epruvete je dodavana određena količina etanola kako bi se postigla homogena smjesa. Izračunati je maseni udio pojedinih komponenata u otopini te su u programu SigmaPlot v11.0 nacrtani binodalni trokomponentni dijagram.

3.2.6.2. Ravnotežne koncentracije, razdjeljivanje faza i izrada binodalnih krivulja za trokomponentne smjese

Odabrani su različiti omjeri nonan-1-ola, vode i etanola (40:40:20, 30:40:30, 50:30:20, 55:30:15, 70:20:10, 27:36:37, 40:53:7, 47:38:15, 40:40:20, 50:20:30) otpipetirani u epruvete, dobro homogenizirani te je otopina ostavljena na sobnoj temperaturi kako bi došlo do razdvajanja komponenata na ekstrakt i rafinat. Iz obje faze su uzeti uzorci i analizirani plinskom kromatografijom na sadržaj etanola i organskog otapala (Poglavlje 3.3.13.). Sadržaj vode kao treće komponente izračunat je iz jednadžbe:

$$V(\text{vodene faze}) = V(\text{voda}) + V(\text{etanol}) + V(\text{ekstraktant}) \quad (4)$$

$$V(\text{organske faze}) = V(\text{voda}) + V(\text{etanol}) + V(\text{ekstraktant}) \quad (5)$$

Isti postupak je ponovljen s ostalim otapalima, ali su odabrani drugačiji omjeri (pentan-1-ol:voda:etanol 40:55:5, 40:50:10, 30:50:20; oktan-1-ol:voda:etanol 40:55:5, 40:50:10, 50:35:15, 30:50:20; oleil alkohol:voda:etanol 30:40:30, 40:40:20, 50:30:20, 55:30:15, 70:20:10, 20:40:40, 30:30:40, 40:30:30, 20:30:50). Rezultati određivanja ravnotežnih koncentracija nanieseni su na trokutni dijagram pri čemu su točke koje razgraničavaju homogeni sustav od nehomogenog međusobno povezane u binodalnu krivulju. Parovi točaka ravnotežnih koncentracija na strani ekstrakta i rafinata povezani su spojnicama. Koeficijent raspodjele etanola K_{DE} računa se kao omjer ravnotežne koncentracije etanola u otapalu i vodi prema jednadžbama:

$$K_{DE} = \frac{w(EtOH)_{org}}{w(EtOH)_{aq}} \quad (6)$$

$$K_{DW} = \frac{w(H_2O)_{org}}{w(H_2O)_{aq}} \quad (7)$$

gdje je: K_{DE} – koeficijent raspodjele za etanol; $w(EtOH)_{org}$ – maseni udio etanola u otapalu; $w(EtOH)_{aq}$ – maseni udio etanola u vodi; K_{DW} – koeficijent razdiobe za vodu; $w(H_2O)_{org}$ – maseni udio vode u otapalu; $w(H_2O)_{aq}$ – maseni udio vode u vodenoj fazi.

Faktor separacije (α) je omjer ravnotežnih koeficijenata raspodjele, a opisuje stupanj selektivnosti tvari u jednom ekstrakcijskom stupnju:

$$\alpha = \frac{K_{DE}}{K_{DW}} \quad (8)$$

3.2.6.3. Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze u prisutnosti komponenata fermentirane hranjive podloge

U graduirane epruvete dodano je 30% vol vol⁻¹ pojedinog otapala ekstraktanta (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol ili oleil alkohol), 70% vol vol⁻¹ kiselinskog hidrolizata kukuruznih oklasaka i 8% suspenzije plijesni. Ukupni volumen iznosio je 20 mL. Smjesa je intenzivno miješana te su vizualno praćene promjene u razdvajanju slojeva kroz 4 h. U drugoj seriji pokusa je smjesa osim plijesni, hidrolizata i otapala sadržavala i 10% vol vol⁻¹ etanola. Iz obje faze su uzeti uzorci za mikroskopiranje i analizu GC metodom (Poglavlje 3.3.13.).

3.2.6.4. Istraživanje ekstraktivnih svojstava ekstraktanata u kontinuiranom sustavu za ekstrakciju

Za provedbu istraživanja uspješnosti kontinuirane ekstrakcije korištena je aparatura opisana u poglavlju 3.1.4.10.. U posudu ekstrakcijskog uređaja stavljena je 8%-tna (vol vol⁻¹) vodena otopina etanola, te je u svakom pokusu dodano 10% (vol vol⁻¹) pojedinog otapala (ekstraktanta). Kolona je spojena s posudom za miješanje cijevima koje su preko peristaltičke pumpe povezane sa srednjom sekcijom vertikalne kolone za razdvajanje ekstrakta od rafinata. Stupnjevito je reguliran broj okretaja (150 – 230 o min⁻¹), vizualno je praćen nestanak sloja otapala i njegovo dispergiranje u vodenoj fazi. Za postojeće brojeve okretaja izračunati su Reynoldsovi brojevi miješala prema jednadžbi (11). Uz intenzivno miješanje otopina je prepumpavana u kolonu za razdvajanje različitim protocima (0,98 L h⁻¹ i 2,04 L h⁻¹). U koloni je vizualno praćeno razdvajanje ekstrakta od rafinata, pojava suspenzije i pjene, a plinskom kromatografijom (Poglavlje 3.3.13.) određeni su sastavi ekstrakta i rafinata. Testirano je pri

kojoj brzini okretaja se dobiva homogena otopina u sekciji za miješanje. Određen je Reynoldsov broj strujanja prema jednažbi (12).

Srednja linearna brzina struanja (w_i):

$$w_i = \frac{F}{A} \quad (9)$$

$$A = r^2 \pi \quad (10)$$

Reynoldsov broj miješala (Re_i):

$$Re_i = \frac{ND^2 \rho}{\mu} \quad (11)$$

Reynoldsov broj strujanja (Re):

$$Re = \frac{w_i D \rho}{\mu} \quad (12)$$

gdje je: F = protok ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$); A = površina poprečnog presjeka kolone (m^2); r = polumjer cijevi (m); N = broj okretaja u minuti (o min^{-1}); D = promjer miješala za Re broj miješala; promjer kolone za Re broj strujanja (m); ρ = gustoća smjese (kg m^{-3}); μ = dinamička viskoznost smjese ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$).

3.2.6.5. Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije etanola

Sastav i količina ekstrakta i rafinata određuje se bilancama mase tvari. Za prvi stupanj ekstrakcije vrijedi:

Totalna bilanca mase:

$$m_F + m_B = m_{M1} = m_{E1} + m_{R1} \quad (13)$$

Bilanca mase ključne sastavnice:

$$m_F \times U_{c,F} + m_O \times U_{c,O} = m_{M1} \times U_{c,M1} = m_{E1} \times U_{c,E1} + m_{R1} \times U_{c,R1} \quad (14)$$

Udio ključne sastavnice u smjesi ekstraktanta i podloge:

$$U_{c,M1} = \frac{(m_F \times U_{c,F} + m_B \times U_{c,B})}{m_{M1}} \quad (15)$$

Odnos masa ekstrakta i rafinata:

$$\frac{m_R}{m_E} = \frac{U_{c,E} - U_{c,M}}{U_{c,M} - U_{c,R}} \quad (16)$$

gdje je: m_F = masa fermentirane podloge (kg); m_B = masa otapala (kg); m_M = masa mješavine, smjese ekstraktanta i podloge (kg); m_E = masa ekstrakta (kg); m_R = masa rafinata (kg); $U_{c,M}$ = maseni udio otopljene tvari (ključne satavnice-etanola) u mješavini; $U_{c,F}$ = maseni udio otopljene tvari (ključne satavnice-etanola) u podlozi; $U_{c,B}$ = maseni udio otopljene tvari (ključne satavnice-etanola) u otapalu; $U_{c,E}$ = maseni udio otopljene tvari (ključne satavnice-etanola) u ekstraktu; $U_{c,R}$ = maseni udio otopljene tvari (ključne satavnice-etanola) u rafinatu.

Koristeći jednadžbe (13-16) i trokutne binodalne dijagrame, za pretpostavljenu količinu podloge s vjerojatnim sadržajem etanola, izračunate su količine ekstrahiranog etanola uz pretpostavku trostupanjnske ekstrakcije i količine uporabljenog otapala 10% (vol vol⁻¹). Proračuni su izvršeni za pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohol.

$$F_{m,F} + F_{m,B} = F_{m,M} = F_{m,R} + F_{m,E} \quad (17)$$

$$F_{m,F} \times U_{c,F} + F_{m,B} \cdot U_{c,B} = F_{m,M} \times U_{c,M} \quad (18)$$

$$F_{m,F} \times U_{c,F} + (F_{m,M} - F_{m,F}) \times U_{c,B} = F_{m,M} \times U_{c,M} \quad (19)$$

$$F_{m,F} \times (U_{c,F} - U_{c,B}) = F_{m,M} \times (U_{c,M} - U_{c,B}) \quad (20)$$

$$\frac{F_{m,F}}{F_{m,M}} = \frac{U_{c,M} - U_{c,B}}{U_{c,F} - U_{c,B}} = \frac{\text{dužina M-B}}{\text{dužina F-B}} \quad (21)$$

$$F_{m,F} \times U_{c,F} + F_{m,B} \times U_{c,B} = (F_{m,F} + F_{m,B}) \times U_{c,M} \quad (22)$$

$$F_{m,F} \times (U_{c,F} - U_{c,M}) = F_{m,B} \times (U_{c,M} - U_{c,B}) \quad (23)$$

$$\frac{F_{m,B}}{F_{m,F}} = \frac{U_{c,F} - U_{c,M}}{U_{c,M} - U_{c,B}} = \frac{\text{dužina F-M}}{\text{dužina M-B}} \quad (24)$$

$$(F_{m,B})_{\min} = F_{m,F} \times \frac{F_{m,B}}{F_{m,F}} \quad (25)$$

$$U_{c,F} \times F_{m,F} + U_{c,B} \times F_{m,B} = U_{c,M} \times F_{m,M} \quad (26)$$

gdje je: $F_{m,F}$ = protok fermentirane podloge (kg h⁻¹); $F_{m,B}$ = protok otapala (kg h⁻¹); $F_{m,M}$ = protok mješavine (kg h⁻¹); $F_{m,E}$ = protok ekstrakta (kg h⁻¹); $F_{m,R}$ = protok rafinata (kg h⁻¹).

Jednadžbe 17-25 korištene su za dobivanje minimalnog protoka otapala, a jednadžba 26 korištena je za izračunavanje udjela etanola u mješavini, te su pomoću tog podatka grafički određeni udjeli etanola u ekstraktu i rafinatu (Prilog 9-10).

3.2.6.6. Izdvajanje ksilitola

Za izdvajanje ksilitola iz modelnih otopina primijenjena je metoda kristalizacije. Korištene su modelne otopine za izdvajanje ksilitola i to otopina ksilitola u destiliranoj vodi koncentracije 700 g L^{-1} ; i supernatant podloge dobivene nakon provedenog uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 (Poglavlje 3.2.5.1) u koju je dodan ksilitol tako da konačna koncentracija ksilitola iznosi 700 g L^{-1} (u ovoj podlozi osim ksilitola nalaze se i drugi spojevi poput etanola, glicerola, neprevrelih šećera i razgradnih produkata lignoceluloze koji nastaju nakon kiseline predobrade u visokotlačnom reaktoru).

Tablica 9. Volumeni i koncentracije otapala korištenih za kristalizaciju ksilitola iz modelnih otopina.

Modelna otopina V [mL]		Otapalo			
		acetone $w = 100\%$	etanol $\varphi = 60\%$	etanol $\varphi = 99,6\%$	izopropanol $w = 100\%$
		V [mL]	V [mL]	V [mL]	V [mL]
(1)	20	20	20	20	80
(2)	20	20	20	20	80

Po 20 mL modelne otopine izmješano je sa 20 mL otapala navedenim u Tablici 9. Tako pripremljeni uzorci hlade se na 4°C tjedan dana, nakon čega su uzorci centrifugirani 15 min pri 6800 o min^{-1} . Supernatant je izdvojen dekantiranjem, a istaloženi ksilitol je osušen do konstantne mase i izvagan na analitičkoj vagi.

Iskorištenje procesa izračunato je prema formuli:

$$Y = \frac{m(\text{istaloženi ksilitol})}{m(\text{ukupni ksilitol})} \times 100 [\%] \quad (27)$$

3.2.6.7. Izdvajanje hitina i hitozana iz biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185

Za izdvajanje hitina i hitozana korišteno je 3 g osušene i usitnjene biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185 dobivene nakon uzgoja u različitim biorektorskim sustavima (Poglavljja 3.2.5.1.-3.2.5.3.). Biomasa je suspendirana u 90 mL 4 M natrijeve lužine i autoklavirana sat vremena pri 121°C (omjer volumena otopine NaOH i mase suhe tvari biomase iznosi 30:1). Alkalno netopljiva frakcija odvojena je centrifugiranjem (6800 o min⁻¹/15 min). Dobiveni supernatant je dekantiran, a netopljivi talog je ispiran do neutralne pH vrijednost (≈pH 7) te je stavljen na sušenje. Suhom i usitnjenom neutraliziranom talogu dodalo se 120 mL 10%-tne (vol vol⁻¹) octene kiseline (omjer volumena otopine kiseline i mase suhe tvari biomase iznosi 40:1) te se dobivena suspenzija kuhala tijekom 6 h uz refluks i povremeno miješanje. Hitin se izdvojio centrifugiranjem pri 6800 o min⁻¹ tijekom 15 min. Zatim se isprao s destiliranom vodom do neutralne vrijednosti, a hitozan se izdvojio iz supernatanta dodavanjem 4 M NaOH i podizanjem pH vrijednosti supernatanta na 9. Vakuum filtracijom na Büchnerovom lijevku izdvojio se hitozan. Kristali hitina i hitozana ispirali su se s destiliranom vodom, etanolom (omjer volumena etanola i mase suhe tvari biomase iznosi 20:1) i acetonom (omjer volumena acetona i mase suhe tvari biomase iznosi 20:1). Dobiveni kristali sušili su se pri 60°C do konstantne mase.

3.3. Analitičke metode

3.3.1. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom ultra djelotvornosti (UPLC)

Prije same analize, uzorci su centrifugirani kako bi se izdvojio supernatant. Nakon toga, supernatant je u omjeru 1:1 (vol vol⁻¹) pomiješan s otopinom ZnSO₄ x 7 H₂O koncentracije 100 g L⁻¹ kako bi se istaložili proteini. Taloženje se provodilo 10 min, a istaloženi proteini su se uklonili ponovnim centrifugiranjem (4000 o min⁻¹, 10 min). Naposljetku, supernatant je filtriran u vijale kroz najlonski filter za šprice promjera pora 0,2 μm. Ovako pripremljeni uzorci analizirani su tekućinskom kromatografijom (Poglavlje 3.1.4.3.). Za analize je korištena analitička kolona Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (15 cm x 7,2 mm, Phenomenex, SAD), a kao mobilna faza tijekom analize korištena je otopina sumporne kiseline u vodi (0,0025 M), temperatura pećnice iznosila je 60°C, temperatura RID detektora 40°C, a injektirano je po 10 μL uzorka uz brzinu protoka mobilne faze od 0,6 mL min⁻¹.

3.3.2. Određivanje celulolitičke i hemicelulolitičke aktivnosti

Koncentracija reducirajućih šećera određena je metodom 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNS) (Miller, 1959). Aktivnost nekoliko celulolitičkih enzima može se procijeniti inkubacijom supernatanta uzorka s različitim celuloznim ili hemiceluloznim supstratima i kvantifikacijom oslobođenih šećera (Tablica 10) standardnom metodom koju je predložio Ghose (1987). Reakcije su zabilježene pomoću Lambda 35 UV/VIS spektrometra. Jedna jedinica enzimske aktivnosti određuje se kao količina enzima koja oslobađa 1 μmol odgovarajućeg reducirajućeg šećera po minuti pod specificiranim uvjetima analize. Specifična aktivnost enzima izražena je kao enzimski jedinica po mg ukupnih proteina.

Tablica 10. Popis enzima i korištenih supstrata za određivanje enzimske aktivnosti DNS-om.

Enzim	Supstrat	Oslobođeni šećer
Škrob degradirajući	Škrob	D-glukoza
Ksilanaze	Ksilan	D-ksiloza
Mananaze	Manan	D-manoza
Arabinaze	Arabinan	L-arabinoza
Endoglukanaze	Celuloza	D-glukoza
Egzoglukanaze	Karboksimetil celuloza	D-glukoze
Pektinaze	Pektin	Galakturonska kiselina

3.3.3. Određivanje lakazne aktivnosti

Ova metoda temelji se na detekciji oksidacije 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS) u ABTS kationski radikal (More i sur., 2011). Reakcijska otopina je pripremljena miješanjem 100 μ L 10 mM ABTS otopine i 880 μ L 100 mM natrij-acetatnog pufera (pH 4,0) u mikrokiveti od 1 mL. Mikrokivete su inkubirane 20 min u vodenoj kupelji na 30°C, nakon čega su stavljene u držač uzoraka. Reakcija je započeta dodavanjem 20 μ L uzorka u kivetu te je praćena pomoću spektrometra (Lambda 35 UV/VIS) na 420 nm. Jedna jedinica enzimske aktivnosti odgovara 1 μ mol ABTS kationskog radikala proizvedenog po min i mL supernatanta. Specifična aktivnost enzima izražena je kao enzimski jedinica po mg ukupnih proteina.

3.3.4. Određivanje lignin peroksidazne aktivnosti

Ova metoda temelji se na oksidaciji veratril alkohola (3,4-dimetoksibenzil alkohola) u veratraldehid (Arora i Gill, 2001). Reakcijska smjesa sastojala se od 1 mL 125 mM natrijevog tartaratnog pufera (pH 3,0), 500 μ L 10 mM veratril alkohola, 500 μ L 2 mM otopine vodikovog peroksida i 500 μ L filtrata kulture. Reakcija je pokrenuta dodatkom vodikovog peroksida, a promjena apsorpcije je praćena na 310 nm. Jedna jedinica enzimske aktivnosti bila je 1 μ mol proizvedenog veratraldehida po min i mL supernatanta. Specifična aktivnost enzima izražena je kao enzimski jedinica po mg ukupnih proteina.

3.3.5. Određivanje celobioza dehidrogenazne aktivnosti

Ova metoda temelji se na redukciji citokroma *c* koji mijenja boju od početne narančaste do crvenkasto ružičaste boje (Ma i sur., 2017). Ukupno 20 μ L otopine citokroma *c*, 100 μ L 300 mM laktoze i 860 μ L 100 mM natrij-acetatnog pufera (pH 4,0) je odpipetirano u čistu kivetu. Kiveta je inkubirana najmanje 20 min na 30°C u vodenoj kupelji, a zatim je stavljena u držač uzoraka. Reakcija je započeta dodavanjem 20 μ L uzorka u otopinu. Apsorbancija je praćena na 520 nm (Lambda 35 UV/VIS) tijekom 2 min. Specifična aktivnost enzima izražena je kao enzimski jedinica po mg ukupnih proteina.

3.3.6. Određivanje koncentracije ukupnih proteina metodom po Bradfordu

Uzorci su pripremljeni miješanjem 15 μ L uzorka sa 600 μ L Bradfordovog reagensa (Bradford, 1976) u plastičnoj kiveti. Kiveta je ostavljena u mraku, na sobnoj temperaturi, 15 min, nakon čega je izmjerena apsorbancija uzoraka na 595 nm pomoću UV/VIS

spektrofotometra (Beckman Coulter DU 800). Koncentracije proteina su automatski izračunate u programskom sustavu.

3.3.7. SDS elektroforeza

Prije početka elektroforeze, 20 μL Laemmlijevog pufera za uzorke dodano je sirovim i djelomično pročišćenim uzorcima. Uzorci su zatim zagrijani pomoću suhe kupelji na 98°C i držani na toj temperaturi 5 min. Za elektroforezu su korišteni Mini-PROTEAN TGX gotovi gelovi, Mini PROTEAN Tetra Cell i PowerPac HC. Spremnik je napunjen s recikliranim $1\times$ tekućim puferom, dok je prostor između gelova napunjen svježe pripremljenim i $10\times$ razrijeđenim tekućim puferom ($30,3\text{ g L}^{-1}$ TRIZMA baze, 144 g L^{-1} glicina, 10 g L^{-1} SDS). U jednu jažicu nanešeno je 15 μL Precision Plus Protein Standarda (Bio-Rad, Hercules, SAD), dok su ostale četiri jažice napunjene sa 15 μL denaturiranih uzoraka. Uzorci su vođeni na 120 V oko sat vremena. Nakon što je elektroforeza završena, gelovi su obojeni QC Colloidal Coomassie blue bojom i isprani destiliranom vodom. Slika gela snimljena je pomoću Universal Hood II Gel Doc sustava.

3.3.8. Identifikacija peptida LC-ESI-MS sustavom

LC-ESI-MS analiza temelji se na prethodno opisanoj metodi (Halada i sur., 2003) i prilagođena je zadanoj aparaturi. U tu svrhu, trake vođene u SDS-PAGE gelu su izrezane i tretirane kimotripsinom. Smjesa peptida analizirana je korištenjem Dionex Ultimate 3000 sustava povezanog s MS instrumentom s „quadrupole time of flight“ (Q-TOF) (maXis 4G ETD; Bruker, Billerica, MA, USA) opremljenim standardnim ESI izvorom u pozitivnom ionu, način akvizicije ovisan o podacima (DDA) (prelazak na MS/MS način rada za eluiranje pikova). Snimljeni su MS skenovi (raspon, 150 do 2200 m/z ; brzine spektra, 1,0 Hz) i odabrano je šest najviših pikova za fragmentaciju (disocijacija izazvana sudarom (CID)). Kalibracija instrumenta izvedena je pomoću ESI kalibracijske smjese (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Za odvajanje peptida korištena je Thermo BioBasic C 18 kolona za odvajanje (veličina čestica 5 μm , 150 x 0,320 mm). Korišten je gradijent od 97% otapala A i 3% otapala B (otapalo A, 65 mM amonij formatni pufer, pH 3,0; otapalo B, 80% acetonitrila i 20% otapala A) do 40% otapala B u 45 min, nakon čega slijedi 15-minutni gradijent od 40% otapala B do 95% otapala B pri protoku od 6 L min^{-1} na 32°C . Za evaluaciju peptida korišten je DataAnalysis 4.0.

3.3.9. Gravimetrijsko određivanje suhe tvari biomase mikroorganizama na kraju uzgoja

Nakon provedenih uzgoja, centrifugiranjem je odvojena biomasa od prevrele hranjive podloge. Dekantiranjem je odvojena hranjiva podloga (supernatant) od biomase (talog). Biomasa je osušena u sušioniku na 50°C do konstantne mase te je koncentracija biomase na kraju uzgoja izračunata sljedećom formulom:

$$X = \frac{m_2 - m_1}{V} \quad (28)$$

gdje je: X = koncentracija biomase na kraju uzgoja (g L⁻¹); m₁ = masa prazne kivete (g); m₂ = masa kivete sa biomasom nakon sušenja (g); V = volumen hranjive podloge (L).

3.3.10. Određivanje koncentracije i sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskom detekcijom

Nakon odvajanja biomase plijesni od hranjivih podloga centrifugiranjem, biomase plijesni su osušene u sušioniku do konstantne mase. Zatim su sastav i koncentracija masnih kiselina u biomasi plijesni *M. indicus* određeni metodom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskom detekcijom (GC-FID). Prije analize uzoraka GC-FID metodom provedena je transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere, a potom ekstrakcija u odgovarajuće otapalo, u ovom slučaju je to bio heksan.

Transesterifikacija masnih kiselina u metilne estere provodila se prema NREL protokolu (Van Wychen i Laurens, 2013). Izvagano je 5 do 10 mg biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185 u staklenim kivetama volumena 10 mL osušenih u eksikatoru preko noći. U kivetu je zatim dodano 20 µL metil tridekanoata (C13:0ME = 10 mg mL⁻¹; interni standard 1), 200 µL otopine kloroform:metanol (2:1, vol vol⁻¹) i 300 µL 0,6 M otopine HCl:metanola. Sadržaj kivete izmiješan je na vibro-mješaču, a nakon toga stavljen u vodenu kupelj na 85°C kroz 1 sat. Nakon termostatiranja u vodenoj kupelji kivete su ohlađene na sobnu temperaturu nakon čega je u ohlađeni uzorak dodan 1 mL heksana. Zatim je sadržaj kivete izmiješan na vibro-mješaču kako bi se provela ekstrakcija nastalih estera u heksansku fazu te ostavljen 1 sat na sobnoj temperaturi da se razdvoje faze. Gornji heksanski sloj se nakon izdvajanja prema potrebi može razrijediti dodatkom heksana. Volumen od 200 µL razrjeđenja heksanske faze otpipetiran je u vialu za plinsku kromatografiju u koju je dodano 5 µL pentadekana (γ = 1 mg mL⁻¹; interni standard 2) i viala je zatvorena s PTFE/silikonskim čepom. Ovako pripremljeni uzorak korišten je za analizu estera masnih kiselina na plinskom kromatografu s plameno-ionizacijskim detektorom.

GC-FID analiza provedena je na plinskom kromatografu GC-2010 Plus (Poglavlje 3.1.4.4.). Uvjeti/parametri metode pri kojima je provedena analiza sastava estera masnih kiselina prikazana je u Tablici 11. Identifikacija i kvantifikacija estera masnih kiselina provedena je usporedbom s retencijskim vremenima i baždarnim dijagramima određenim za metilne estere standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24, Supelco) prema uvjetima navedenim u tablici 7. Koncentracija masnih kiselina dobivena je određivanjem površine ispod pika primjenom softvera GC Solutions verzija 2.32 i integratora ugrađenog u uređaj. Sastav metilnih estera masnih kiselina izražen je prinosom pojedine masne kiseline po g suhe tvari biomase (mg g^{-1}) i masenim udjelom (%) ukupnih masnih kiselina u uzorku.

Tablica 11. Parametri GC-FID metode za određivanje sastava i koncentracije estera masnih kiselina.

Parametar	Uvjeti
Kolona	ZB-FAME (Zebron), 30 m x 0,25 mm, d_f 0,20 μm
Detektor	FID
Plin nosač/ protok	Helij / 1,2 mL min^{-1}
Temperaturni program	100°C, 4 min
	10°C / min $\rightarrow$ 140°C
	3°C / min $\rightarrow$ 190°C
	30°C / min do 260°C
	260°C, 2 min
Temperatura injektora	250°C
Temperatura detektora	260°C
Koeficijent razdjeljenja	1:15
Volumen injektiranja	2 μL

Izračun ukupnih masnih kiselina provodi se prema formuli:

$$\text{Ukupni lipidi}_{c13 \text{ normal}} = \sum_{C4-C24} \frac{FAME_{ci}}{FAME_{c13}} \times c_{\text{dodanog FAME c13}} \quad (29)$$

Izračun ukupnih masnih kiselina kao postotka na suhu tvar biomase uzetog za transesterifikaciju:

$$\% \text{ ukupni FAME} = \frac{\text{ukupni FAME c13 normal}}{\text{masa suhe tvari uzorka}} \times 100 \quad (30)$$

3.3.11. Određivanje optičke gustoće hranjive podloge

Apsorbancija uzoraka hranjivih podloga mjerena je u području valnih duljina (λ) od 350 do 900 nm spektrofotometrom iz Poglavlja 3.1.4.5. Prirast biomase praćen je pri valnoj duljini od 660 nm. Uzorci su prije analize dobro homogenizirani, a za mjerenja su korištene kvarcne kivete širine 10 mm.

3.3.12. Ekstrakcija ukupnih pigmenata i spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila *a*

Ekstrakcija ukupnih pigmenata sintetiziranih tijekom uzgoja provedena je sa smjesom organskih otapala uz mehaničku dezintegraciju stanica pomoću staklenih kuglica. Volumen uzorka za ekstrakciju pigmenata tijekom mikroaerofilnih uzgoja na svjetlu bio je 5 mL, odnosno 20 mL kod uzgoja u bioreaktoru s miješalom u aerobnim uvjetima. Uzorak je centrifugiran 10 min pri 8000 o min⁻¹. Supernatant je dekantiran, a preostala biomasa se koristila za ekstrakciju i određivanje ukupnih pigmenata. Biomasi je dodano 4 g staklenih kuglica i 4 mL smjese acetona i etanola u omjeru 7:2 (vol vol⁻¹). Biomasa s kuglicama za dezintegraciju stanica se zatim tri puta naizmjenično podvrgavala intenzivnom miješanju u trajanju od 2 min te hlađenju u ledu. U svrhu sprječavanja raspada fotosenzibilnih pigmenata uslijed izlaganja svjetlosti, postupak ekstrakcije je proveden u mraku, a kivete su bile zaštićene aluminijskom folijom. Nakon provedene ekstrakcije, uzorak je centrifugiran 10 min pri 8000 o min⁻¹. Spektrofotometrijsko određivanje bakterioklorofila *a* u supernatantu nakon ekstrakcije odrađeno je u kvarcnoj kiveti skeniranjem u području valnih duljina od 350 do 900 nm. Koncentracija ukupnih pigmenata izračunata je prema izrazu za ekstrakciju primjenom smjese otapala etanol/acetona (Ritchie, 2018):

$$P = 0,348209 \times (A_{648} - A_{850}) - 0,16583 \times (A_{665} - A_{850}) + 12,11114 \times (A_{775} - A_{850}) \text{ (mg L}^{-1}\text{)} \quad (31)$$

3.3.13. Analiza uzoraka izdvajanja etanola plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskom detekcijom

Baždarni pravci za određivanje etanola u vodenoj otopini i u ekstraktima (koji sadrže pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol ili oleil alkohol kao organsko otapalo) načinjeni su plinskom kromatografijom smjesa koje su sadržavale 1200 μL acetona, 150 μL heksanola i 150 μL uzorka. Uzorak se sastojao od etanola (0,5%; 1%; 3%; 5%; 8% (vol/vol) i otapala (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohol).

U postupku određivanja sastava ekstrakta i rafinata (u svrhu konstrukcije binodalnih krivulja) izuzeti je dio organske i vodene faze iz svake epruvete. Uzorci su analizirani plinskom kromatografijom. U kivetu je otpipetirano 150 μL ekstrakta odnosno rafinata, 150 μL heksanola i 1200 μL acetona.

Uzorci koji su sadržavali kulturu plijesni *M. indicus* prethodno su centrifugirani (4500 g, 10 min, 4°C) čime je izdvojena biomasa. Iz dobivenih supernatanta izuziman je uzorak koji je analiziran plinskom kromatografijom. U kivetu je otpipetirano 150 μL supernatanta, 150 μL heksanola i 1200 μL acetona.

Nakon pripreme uzorka špricom za automatski injektor ($V = 10 \mu\text{L}$; SGE Analytical Science Pty Ltd., Ringwood, Australija) uzeto je 1 μL priređenog uzorka i injektorom uvedeno u struju plina nosioca - helija. Temperatura sustava za evaporaciju bila je 210 °C tako su sve komponente prevedene u plinoviti oblik i uvedene u kolonu. Za održavanje plamena u plameno-ionizacijskom detektoru korišteni su sintetski zrak i vodik. Početna temperatura kolone za kromatografiju održavana je pri 90°C kroz 2 min, zatim je povećavana brzinom od 20°C min⁻¹ do 240°C te je na ovoj temperaturi održavana kroz 4 min. Koncentracija etanola i ekstraktanta je dobivena određivanjem površine ispod pika primjenom softvera GC Solutions verzija 2.32 i integratora ugrađenog u uređaj.

3.3.14. Pokazatelji uspješnosti bioprocesa

Na temelju prikazanih jednadžbi izračunati su pokazatelji uspješnosti uzgoja:

$$Y_S = S_0 - S \quad (32)$$

$$Y_P = P - P_0 \quad (33)$$

$$\ln S = \ln S_0 + r_S \times t \quad (34)$$

$$\ln P = \ln P_0 + r_P \times t \quad (35)$$

$$Y_{P/S} = \frac{Y_P}{Y_S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (36)$$

$$Y_{X/S} = \frac{Y_{XP}}{Y_S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (37)$$

$$E = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S}^{teor.}} \quad (38)$$

$$Pr_P = \frac{Y_P}{t_{uk}} \quad (39)$$

gdje je: S_0 , P_0 = početna koncentracija supstrata, odnosno produkta (g L^{-1}); S , P = konačna koncentracija supstrata, odnosno produkta (g L^{-1}); X_0 = početna koncentracija biomase (g L^{-1}); X = konačna koncentracija biomase (g L^{-1}); Y_S = ukupna potrošnja supstrata (g L^{-1}); Y_P = ukupni prinos produkta (g L^{-1}); $Y_{P/S}$ = koeficijent konverzije supstrata u produkt (g g^{-1}); $Y_{X/S}$ = koeficijent konverzije supstrata u biomasu (g g^{-1}); E = efikasnost procesa (%); $Y_{P/S}^{teor.}$ = maksimalni mogući teoretski koeficijent konverzije supstrata u produkt (g g^{-1}); r_S = maksimalna brzina potrošnje supstrata (h^{-1}); r_P = maksimalna brzina nastanka produkta (h^{-1}).

4. REZULTATI

4. REZULTATI

Primjena biorafinerijskog pristupa omogućava proizvodnju više različitih proizvoda iz jedne vrste sirovine kombinirajući kemijske i biološke metode pomoću jednog ili više vrsta mikroorganizama (Marđetko i sur., 2021; Rajak i sur., 2020). U ovom radu primijenjen je biorafinerijski pristup obradi otpadne lignocelulozne sirovine, s ciljem dobivanja više različitih biokemikalija i biogoriva (etanola, ksilitola, hitina, hitozana, masnih kiselina i pigmenata).

Rezultati ovog rada podijeljeni su u nekoliko međusobno povezanih poglavlja.

U Poglavlju 4.1. prikazani su rezultati obrade i pripreme lignoceluloznih sirovina za proizvodnju biokemikalija. Rezultati kiselinske predobrade nekoliko različitih lignoceluloznih sirovina (slama, otpadna trava, kukuruzovina i kukuruzni oklasci) u visokotlačnom reaktoru pri različitim temperaturama i vremenima zadržavanja prikazani su u potpoglavlju 4.1.1. U potpoglavlju 4.1.2. prikazani su rezultati enzimske hidrolize PKO s komercijalnim enzimima Viscozyme L (Novozyme) i Cellulase, enzyme blend (Sigma-Aldrich). Ujedno su prikazani i rezultati optimizacije dobiveni obradom eksperimentalnih podataka kako bi se odredila najučinkovitija kombinacija koncentracije supstrata i enzima za provedbu uspješne enzimske hidrolize PKO. Kako su visoki troškovi enzima jedan od glavnih čimbenika u ukupnim troškovima proizvodnje biogoriva ili biokemikalija (Andlar i sur., 2018; Bušić i sur., 2018), stoga su u potpoglavlju 4.1.3. prikazani rezultati istraživanja uzgoja različitih vrsta plijesni u svrhu proizvodnje enzima koji sudjeluju u razgradnji lignoceluloznih sirovina. Konačni cilj je bio odabir najboljeg proizvođača lignocelulolitičkih enzima, koji se mogu koristiti u konverziji kompleksne strukture odabrane lignocelulozne sirovine u jednostavnije fermentabilne šećere. Prvo je istražen potencijal ovih plijesni za proizvodnju enzima, dok je drugi dio istraživanja bio usmjeren prema točnijem određivanju enzimske aktivnosti. S obzirom na sastav sirovine koja se koristila u istraživanju, za potpunu enzimsku hidrolizu bili su potrebni enzimi koji razgrađuju celulozu, hemicelulozu i lignin.

U Poglavlju 4.2. prikazani su rezultati uzgoja odabranih vrsta mikroorganizama (kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y9, plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 i bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781) u svrhu optimizacije procesa proizvodnje biogoriva i biokemikalija. Potpoglavlje 4.2.1. sadržava rezultate u kojima su provedeni uzgoji kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y9 i plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u podlogama s glukozom, ksilozom te glukozom i ksilozom u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Analizom i usporedbom uspješnosti

bioprocesa, pokazano je da plijesan *Mucor indicus* DSM 2185, zadovoljava odabrane kriterije te je ta plijesan korištena kao radni mikroorganizam u svim kasnijim eksperimentalnim istraživanjima. S ciljem odabira najpogodnijeg izvora dušika te kako bi se pronašla zadovoljavajuća alternativa za relativno skup izvor dušika – kvašćev ekstrakt (potpoglavlje 4.2.2.) provedeni su uzgoji *Mucor indicus* u podlogama s različitim izvorima dušika (anorganske soli, mesni ekstrakt, kvašćev ekstrakt i CSL). Potom su provedeni uzgoji na BKHKO sa i bez dodatka izvora dušika (potpoglavlje 4.2.3.) U istom potpoglavlju prikazani su i rezultati utjecaja različitih izvora dušika na profil masnih kiselina izoliranih iz biomase plijesni. Nekoliko podloga dobivenih nakon uzgoja plijesni *M. indicus* korištene su kao hranjiva podloga za proizvodnju biomase i pigmenata bakterije *R. adriaticum* DSM 2781. Rezultati tih uzgoja prikazani su u potpoglavlju 4.2.4. U potpoglavlju 4.2.5. prikazani su uzgoji plijesni *Mucor indicus* na kiselinski predobrađenim, ispranim i usitnjenim kukuruznim oklascima tehnikom simultane saharifikacije i fermentacije pri različitim temperaturama, uz dodatak komercijalnih enzimskih pripravaka u MHP i acetatnom puferu.

Nakon provedenih istraživanja u malom mjerilu (Poglavlja 4.1 i 4.2), u Poglavlju 4.3. prikazani su rezultati bioprocesa uzgoja plijesni *Mucor indicus* provedeni u većem mjerilu korištenjem različitih izvedba bioreaktora (bioreaktor s miješalom, barbotirajuća kolona i HRCB) za proizvodnju biogoriva i biokemikalija s ciljem odabira najpogodnijeg bioreaktorskog sustava. U uzgojima je korišten BKHKO kao i E-PKO. Nakon odabira optimalnog bioreaktorskog sustava, u Poglavlju 4.3.5. prikazani su rezultati eksperimentalnog istraživanja u kojem je tekući dio hranjive podloge iz uzgoja plijesni (TOHP) dalje korištena kao sirovina za drugi mikrobní proces u kojem je proizvedena biomasa fototrofnih ljubičastih nesumpornih bakterija, točnije bakterije *Rhodovulum adriaticum*. Bakterija je uzgajana u bioreaktoru s miješalom u anaerobnim uvjetima uz prisustvo svjetla u svrhu proizvodnju pigmenata i biokemikalija. U velikom mjerilu proveden je i proces simultane saharifikacije i fermentacije pri prethodno određenoj optimalnoj temperaturi procesa, a rezultati su prikazani u podpoglavlju 4.3.6.

U Poglavlju 4.4. prikazani su rezultati izdvajanja i pročišćavanja biokemikalija. U potpoglavlju 4.4.1. mogu se vidjeti rezultati eksperimenata vezanih uz ekstrakciju etanola višim alkoholima, potpoglavlje 4.4.2. prikazuje rezultate izdvajanja ksilitola iz modelnih otopina, dok potpoglavlje 4.4.3. zbog specifičnog sastava stanične stijenke plijesni, sadrži rezultate izdvajanja hitina i hitozana iz biomase plijesni *Mucor indicus* dobivene nakon procesa u različitim bioreaktorskim sustavima.

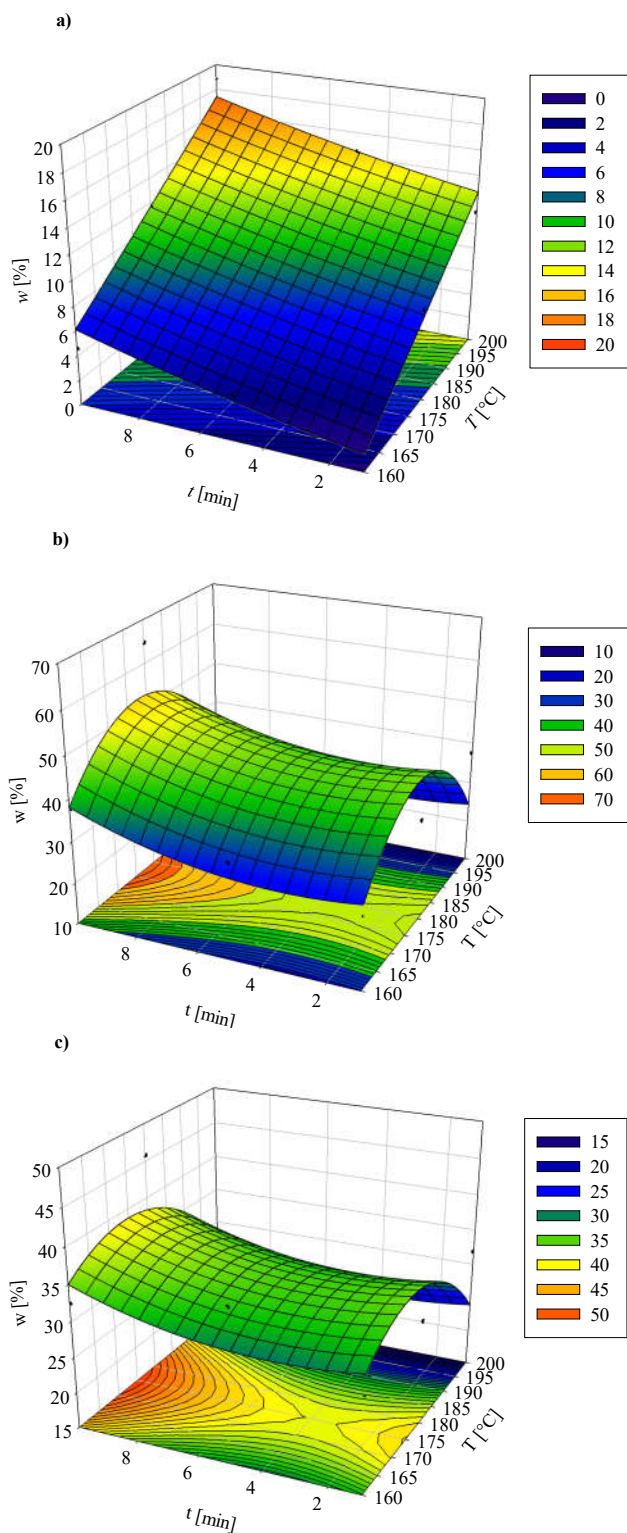
U Poglavlju 4.5. prikazana je procesna shema integriranoga biorafinerijskoga sustava proizvodnje biokemikalija i biogoriva iz lignocelulozne sirovine-kukuruznih oklasaka, pomoću plijesni *Mucor indicus* i bakterije *Rhodovulum adriaticum* te materijalne bilance tih procesa.

4.1. Fizikalno-kemijska i biološka predobrada te priprema otpadnih lignoceluloznih sirovina za proizvodnju specifičnih biokemikalija i biogoriva u biorafinerijskom sustavu

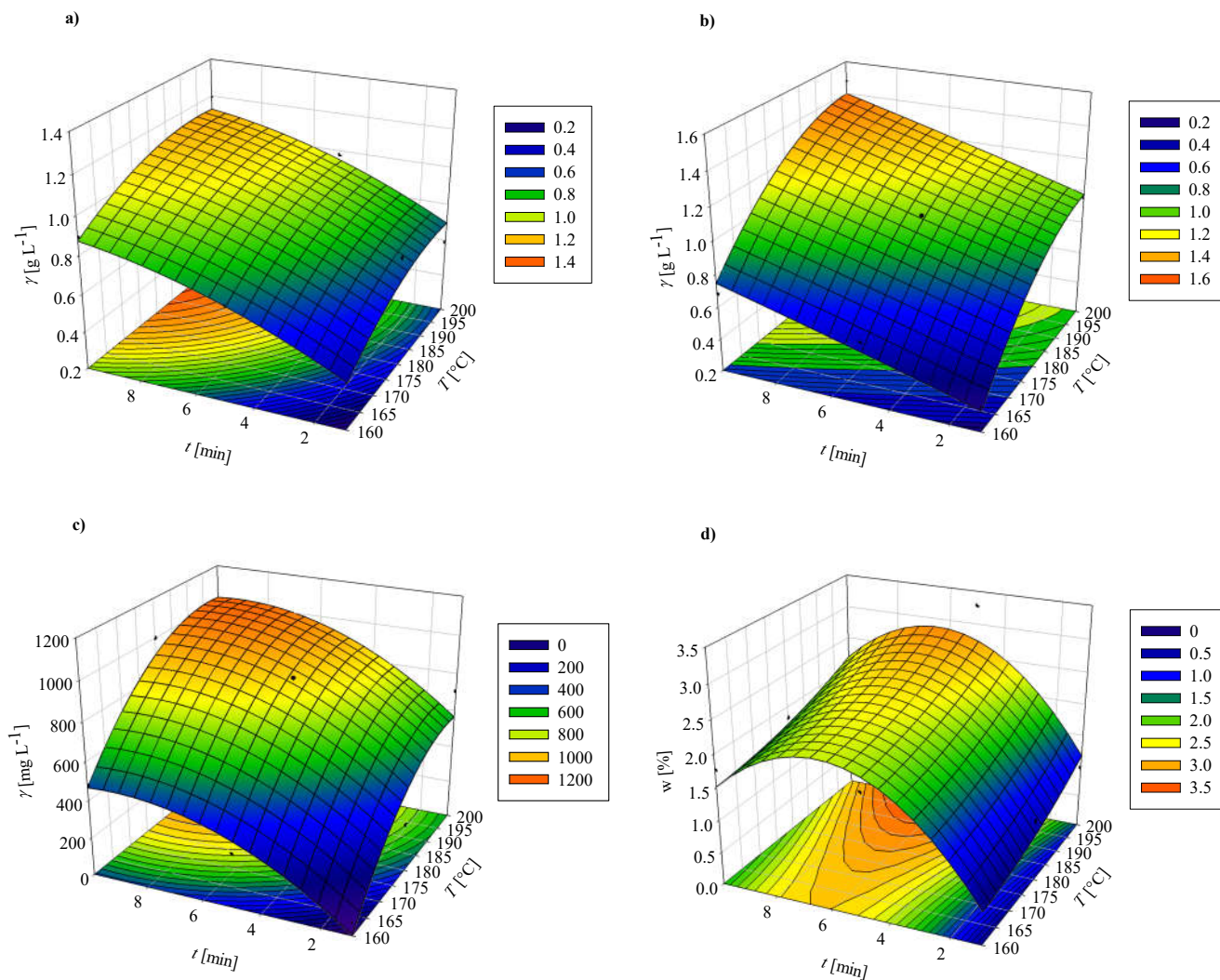
4.1.1. Fizikalno-kemijska predobrada otpadnih lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature

U ovom poglavlju prikazani su rezultati kiselinske predobrade lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru (Poglavlje 3.2.1.). Korištene lignocelulozne sirovine su: slama (Poglavlje 4.1.1.1.), otpadna trava (Poglavlje 4.1.1.2.), kukuruzovina (Poglavlje 4.1.1.3.) i kukuruzni oklasci (Poglavlje 4.1.1.4.). Preliminarno je ispitivan utjecaj različitih koncentracija sumporne i fosforne kiseline te raspona temperatura od 150°C do 210°C na uspješnost procesa obrade pri određenom vremenu zadržavanja. Nakon obrade dobivenih rezultata, detaljnije su provedeni eksperimenti utjecaja temperature (160°C, 180°C i 200°C) i vremena zadržavanja (1 min, 5 min i 10 min) na uspješnost procesa predobrade sirovina s 0,5%-tnom sumpornom kiselinom. Rezultati su prikazani kao sastavi tekućih faza (maseni udio glukana, ksilana i arabinana od ukupno prisutnih u početnoj sirovini, te koncentracije inhibitora: octena, mravlja, furani, lignin topljiv u kiselini (LTK)) te čvrstih faza dobivenih nakon predobrade razrijeđenom sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru (Slika 9-20).

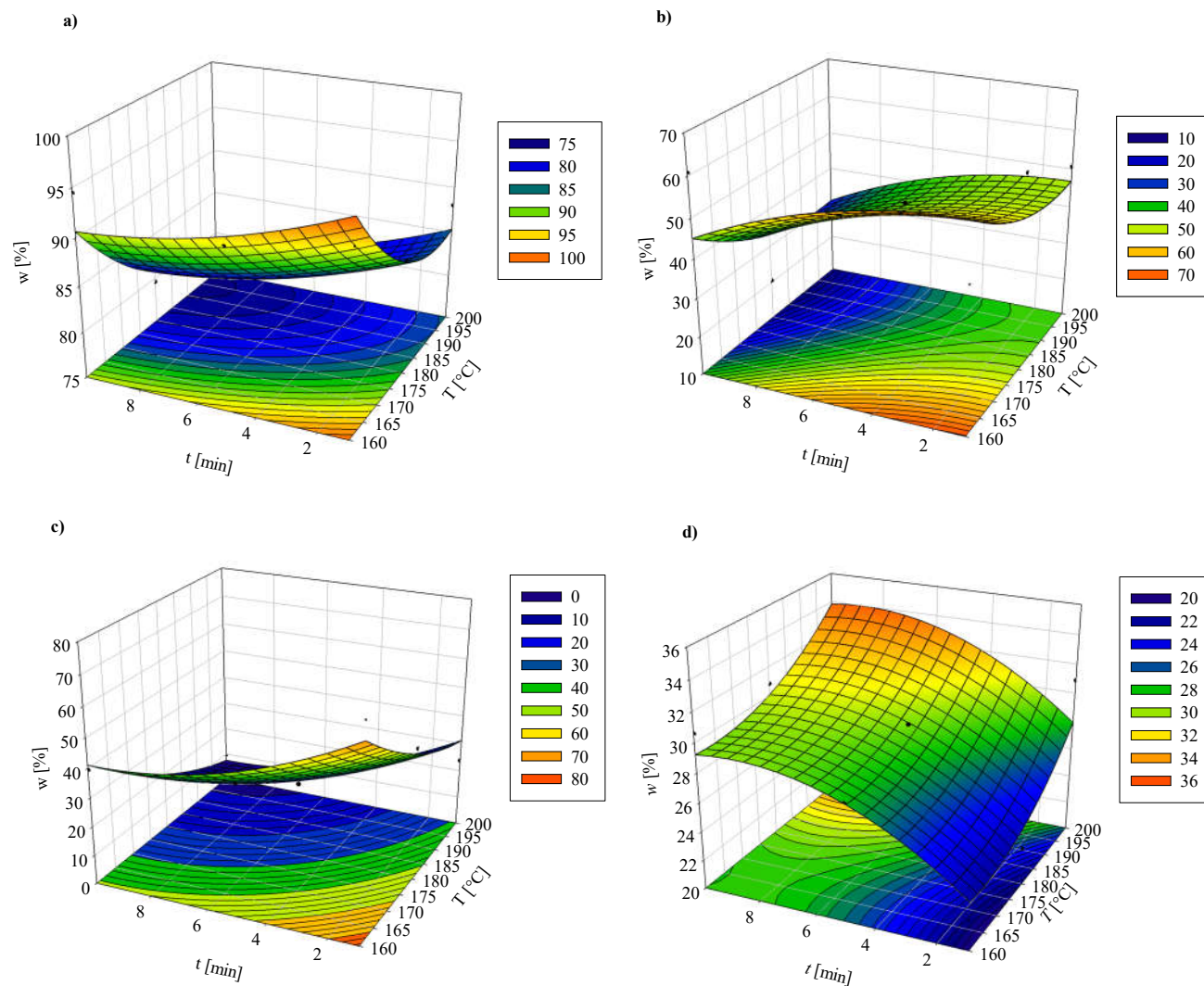
4.1.1.1. Fizikalno-kemijska predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature



Slika 9. Oštećenje: a) glukana; b) ksilana, c) arabinana, u tekućem dijelu hidrolizata, u ovisnosti o vremenu zadržavanja i temperaturi nakon predobrade slame s 0,5% m vol⁻¹ sumpornom kiselinom.

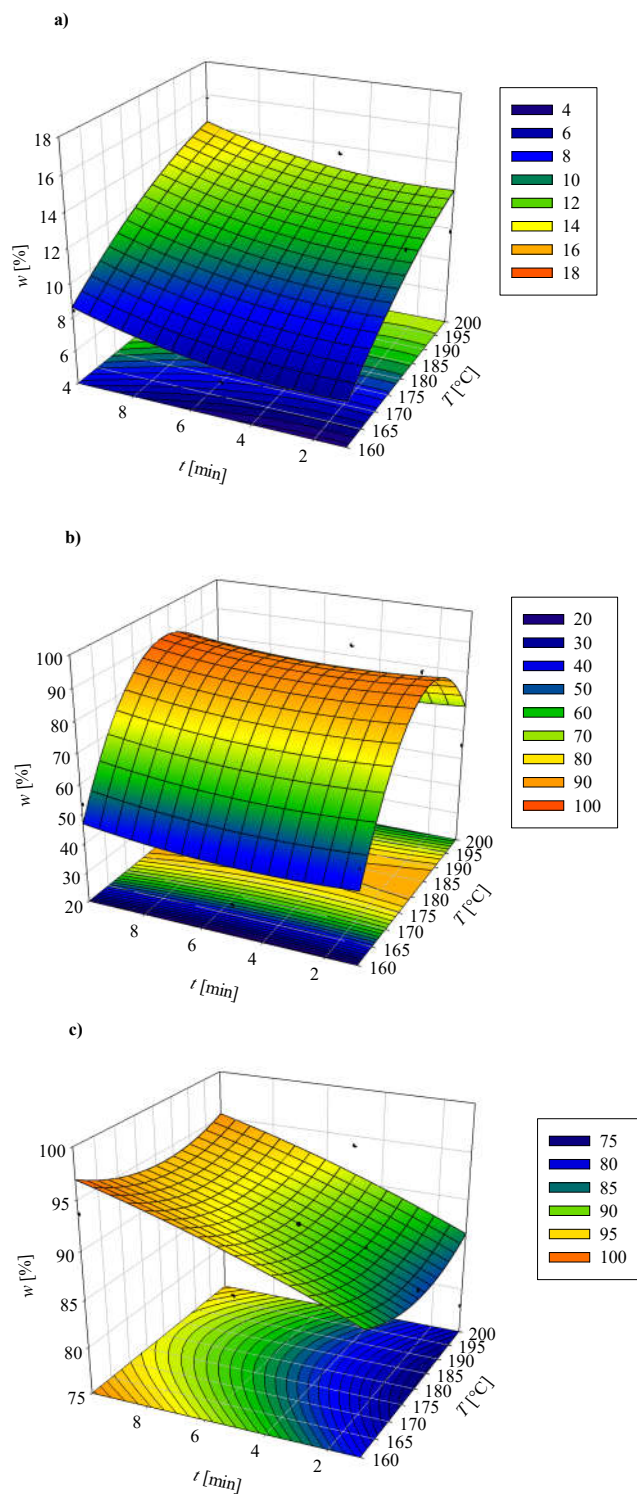


Slika 10. Koncentracije: a) octene kiseline; b) mravlje kiseline; c) furan; d) LTK, prisutnih u tekućem dijelu hidrolizata u ovisnosti o vremenu zadržavanja i temperaturi nakon predobrade slame s $0,5\%$ m vol^{-1} sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru.

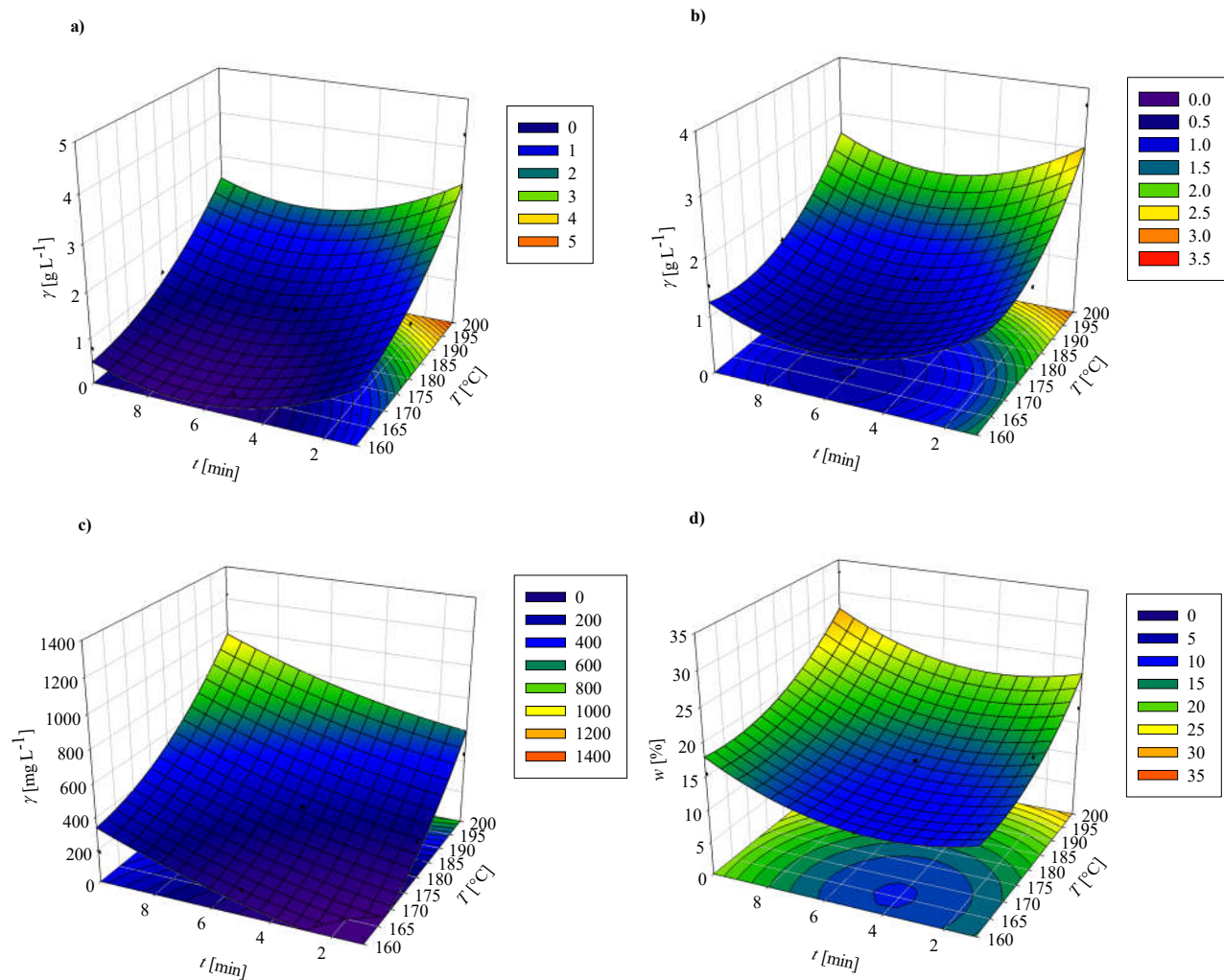


Slika 11. Maseni udio: a) glukana, b) ksilana, c) arabinana, d) LNTK, iz izvorne sirovine prisutnih u čvrstom dijelu u ovisnosti o vremenu zadržavanja i temperaturi nakon predobrade slame s $0,5\% \text{ m vol}^{-1}$ sumpornom kiselinom u visokotlačnom rektoru.

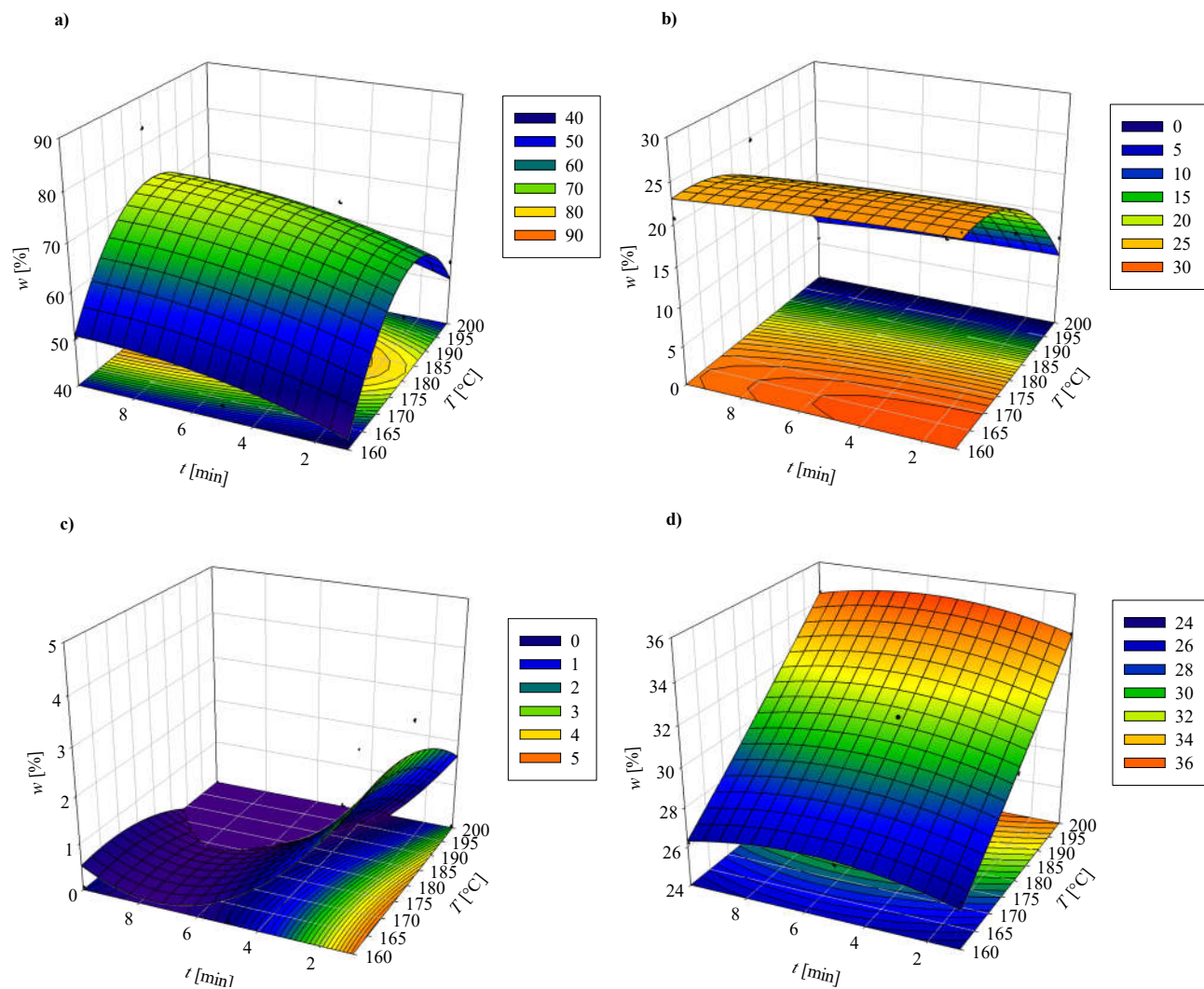
4.1.1.2. Fizikalno-kemijska predobrada otpadne trave u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature



Slika 12. Ošecerenje: a) glukana; b) ksilana, c) arabinana, u tekućem dijelu hidrolizata u ovisnosti o vremenu zadržavanja i temperaturi nakon predobrade otpadne trave s 0,5% m vol⁻¹ sumpornom kiselinom.

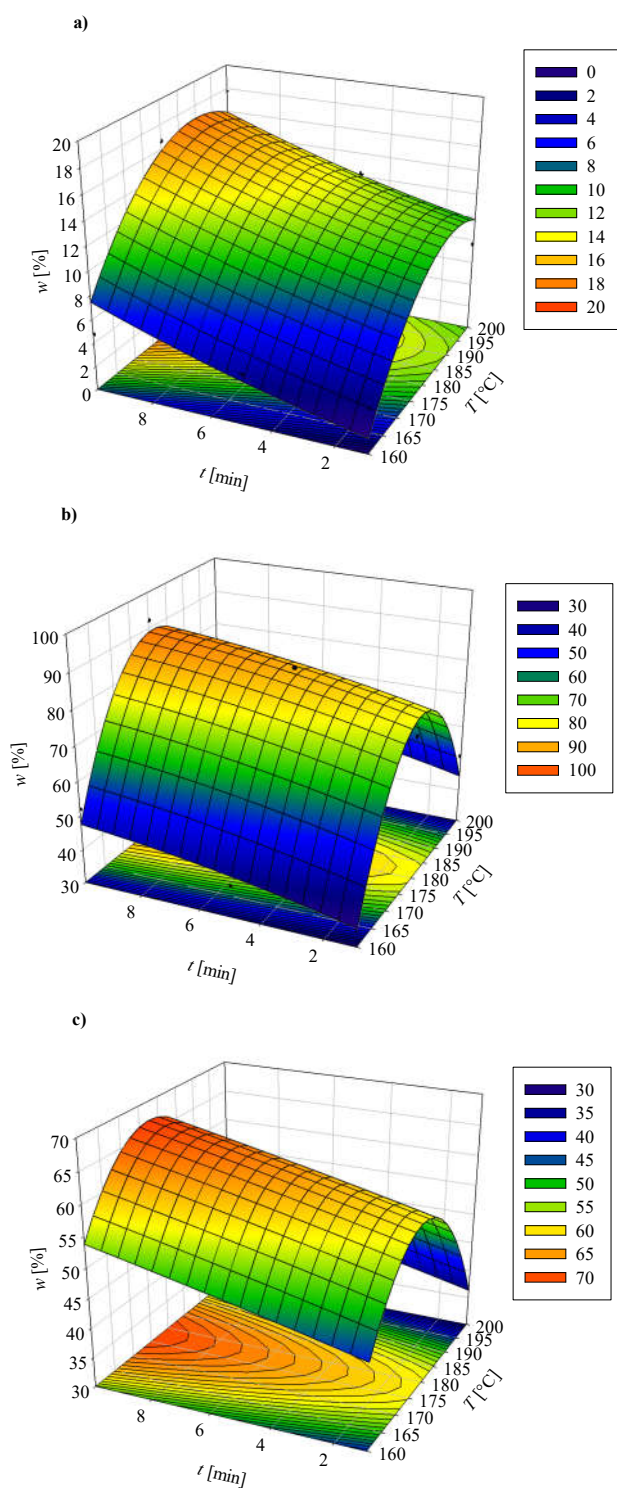


Slika 13. Koncentracije: a) octena kiselina; b) mravlja kiselina; c) furani; d) LTK, prisutnih u tekućem dijelu hidrolizata u ovisnosti o vremenu zadržavanja i temperaturi nakon predobrade otpadne trave s 0,5% m vol⁻¹ sumpornom kiselinom.

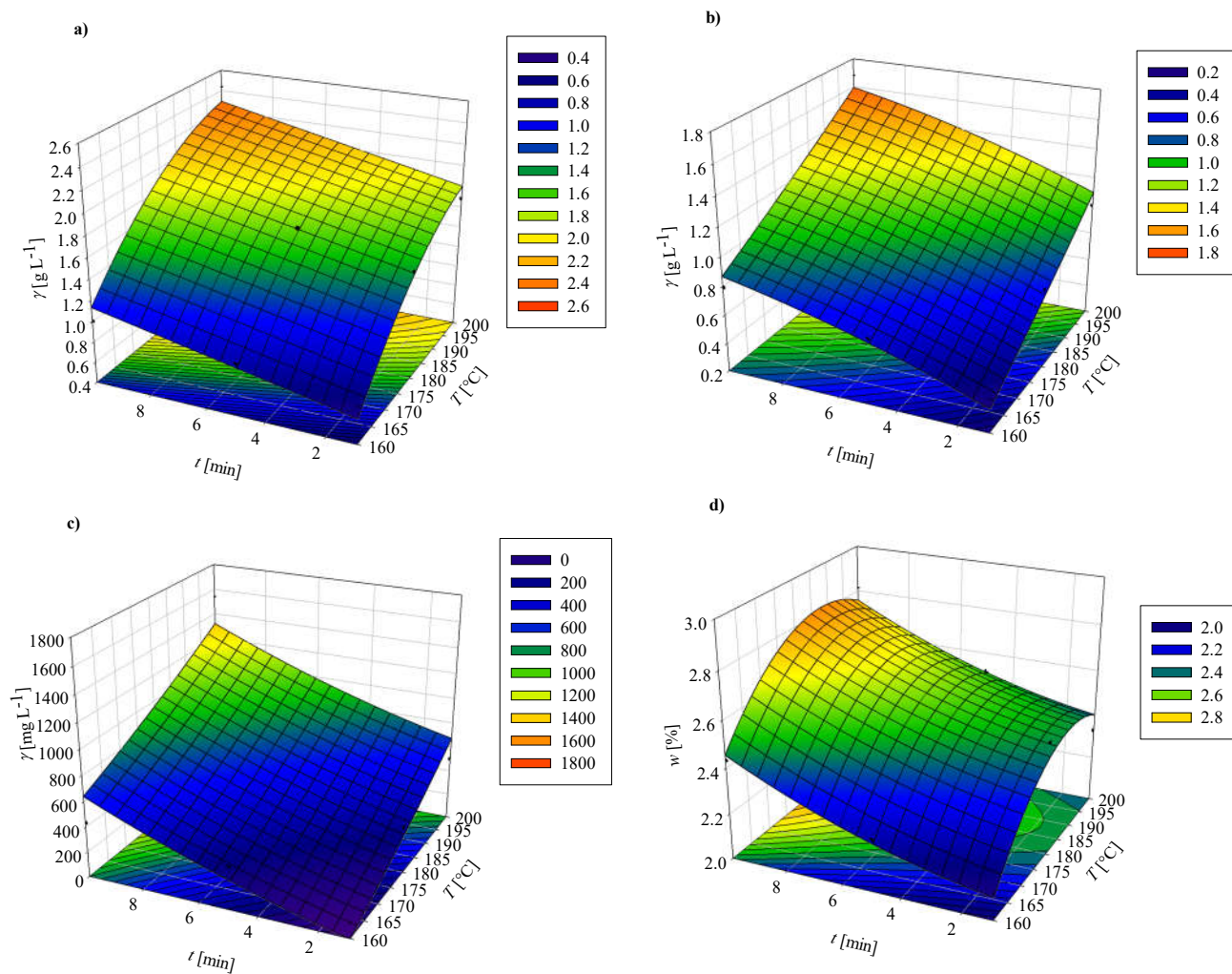


Slika 14. Maseni udio: a) glukana, b) ksilana, c) arabinana, d) LNTK, iz izvorne sirovine prisutnih u čvrstom dijelu u ovisnosti o vremenu zadržavanja i temperaturi nakon predobrade otpadne trave s $0,5\% \text{ m vol}^{-1}$ sumpornom kiselinom.

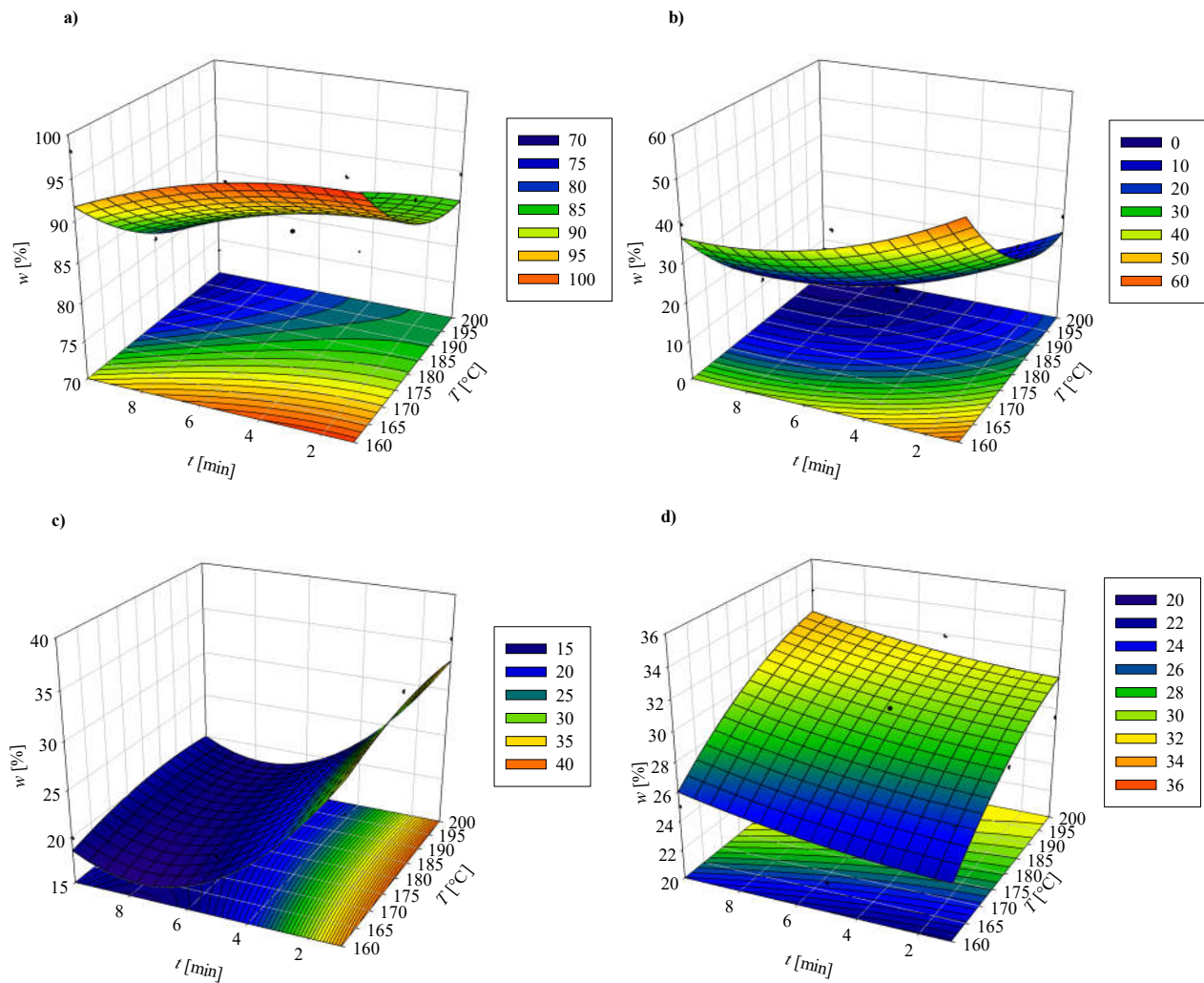
4.1.1.3. Fizikalno-kemijska predobrada kukuruzovine u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature



Slika 15. Ošećerenje: a) glukana; b) ksilana, c) arabinana, u tekućem dijelu hidrolizata u ovisnosti o vremenu zadržavanja i temperaturi nakon predobrade kukuruzovine s $0,5\% \text{ m vol}^{-1}$ sumpornom kiselinom.

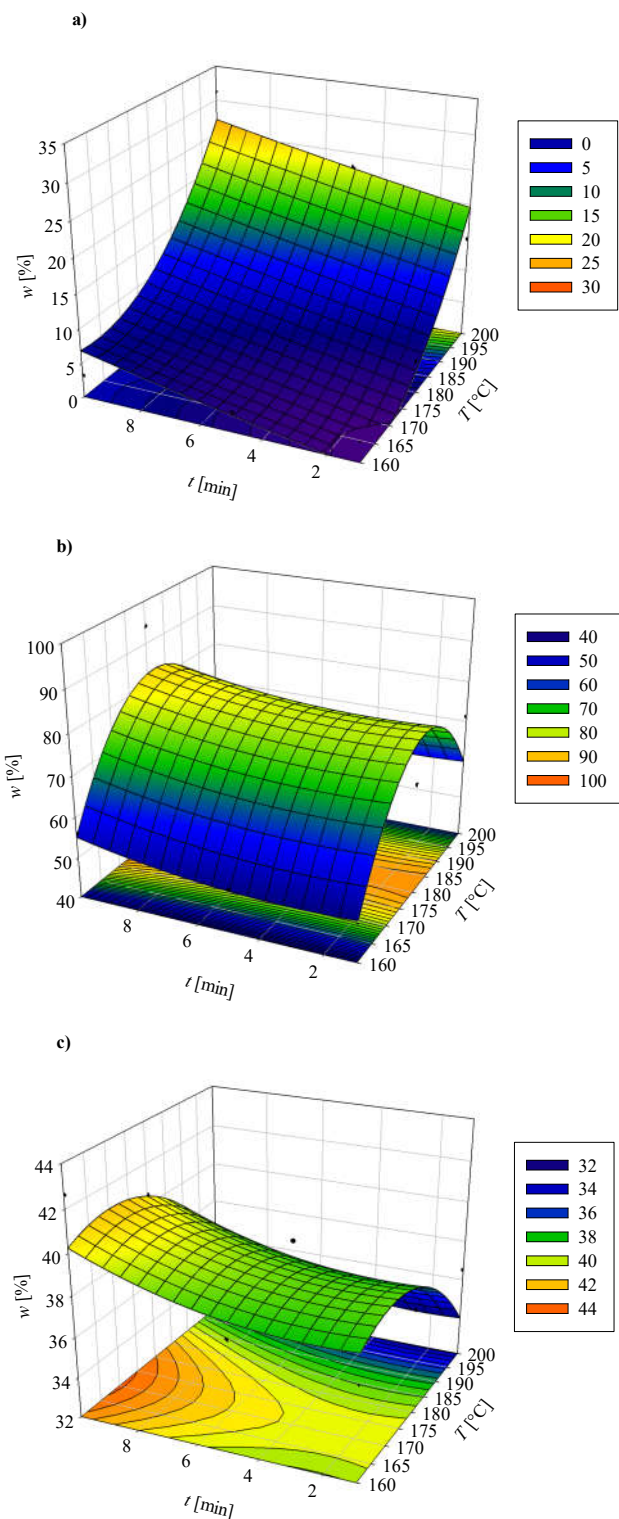


Slika 16. Koncentracije: a) octena kiselina; b) mravlja kiselina; c) furani; d) LTK, prisutnih u tekućem dijelu hidrolizata u ovisnosti o vremenu zadržavanja i temperaturi nakon predobrade kukuruzovine s 0,5% m vol⁻¹ sumpornom kiselinom.

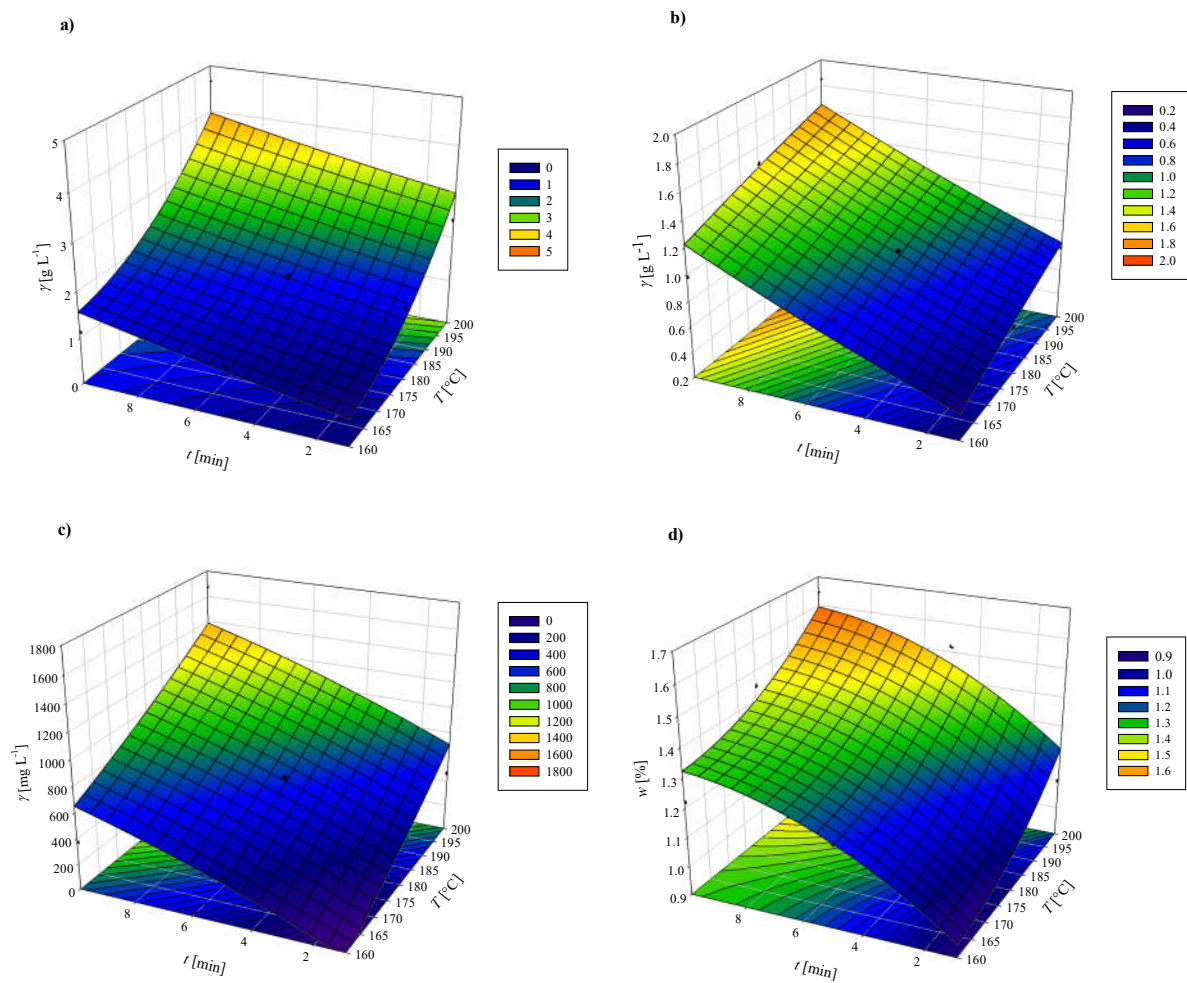


Slika 17. Maseni udio: a) glukana, b) ksilana, c) arabinana, d) LNTK, iz izvorne sirovine prisutnih u čvrstom dijelu u ovisnosti o vremenu zadržavanja i temperaturi nakon predobrade kukuruzovine s $0,5\% \text{ m vol}^{-1}$ sumpornom kiselinom.

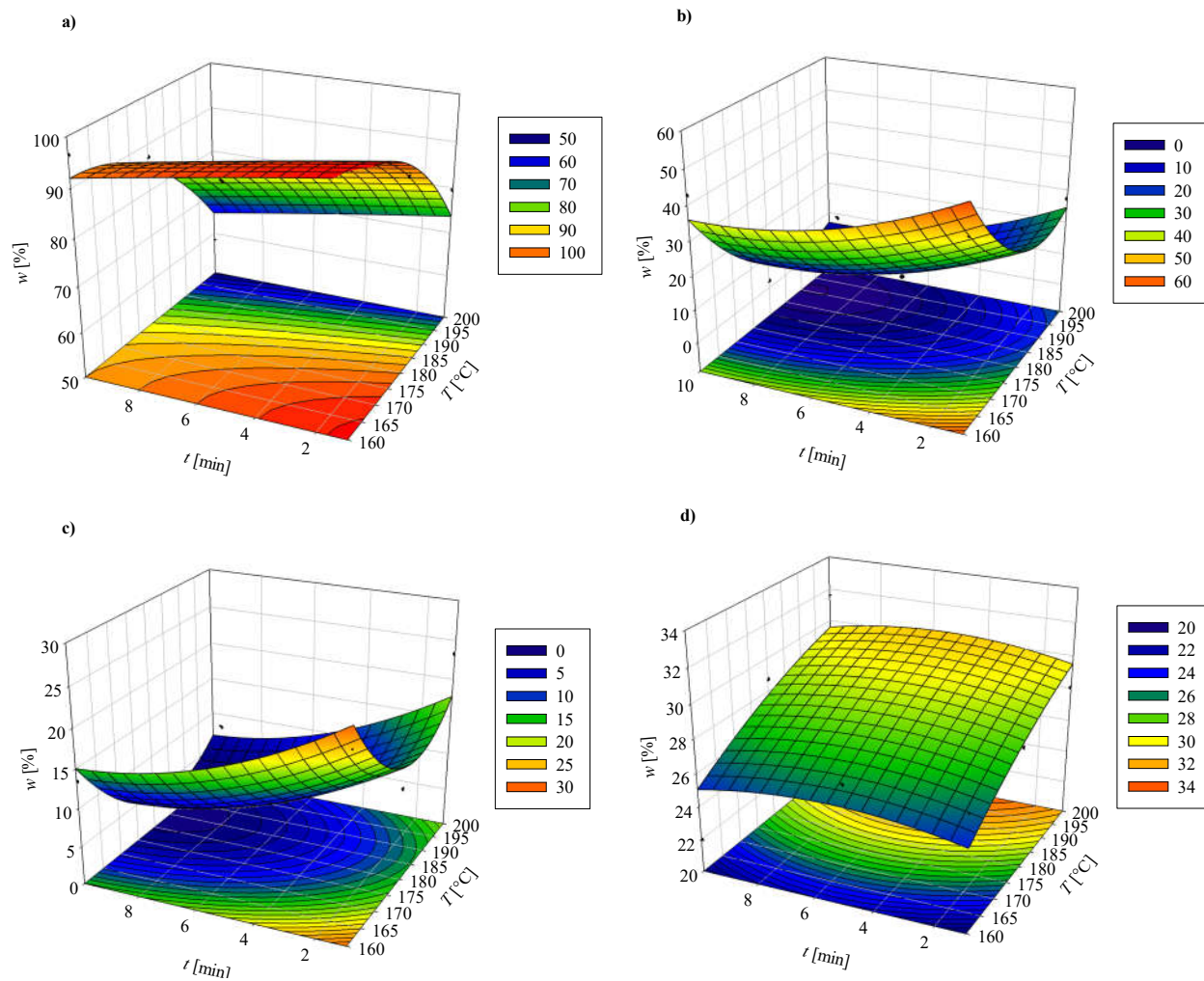
4.1.1.4. Fizikalno-kemijska predobrada kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature



Slika 18. Ošecerenje: a) glukana; b) ksilana, c) arabinana, u tekućem dijelu hidrolizata u ovisnosti o vremenu zadržavanja i temperaturi nakon predobrade kukuruznih oklasaka s 0,5% m vol⁻¹ sumpornom kiselinom.



Slika 19. Koncentracije inhibitora: a) octena kiselina; b) mravlja kiselina; c) furani; d) LTK, prisutnih u tekućem dijelu hidrolizata u ovisnosti o vremenu zadržavanja i temperaturi nakon predobrade kukuruznih oklasaka s 0,5% m vol⁻¹ sumpornom kiselinom.



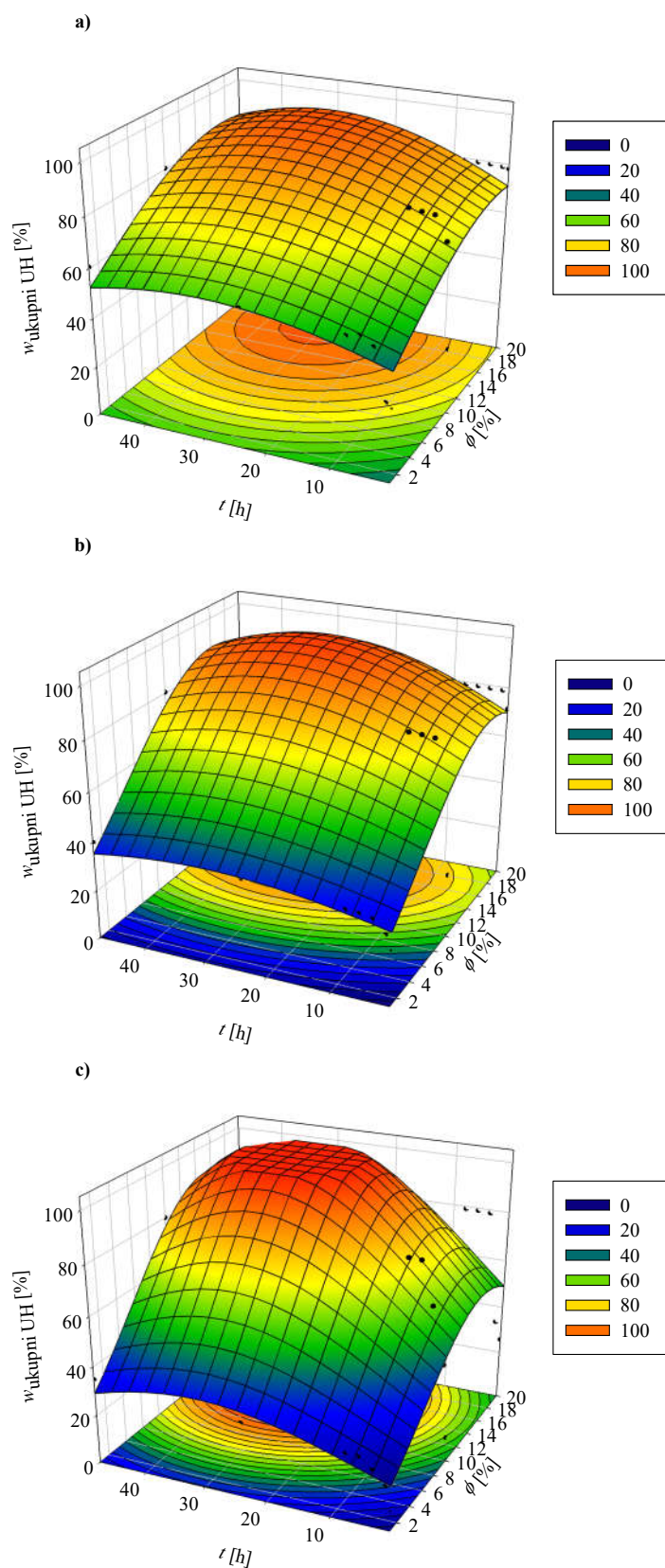
Slika 20. Maseni udio: a) glukana, b) ksilana, c) arabinana, d) LNTK, iz izvorne sirovine prisutnih u čvrstom dijelu u ovisnosti o vremenu zadržavanja i temperaturi nakon predobrade kukuruznih oklasaka s $0,5\% \text{ m vol}^{-1}$ sumpornom kiselinom.

4.1.2. Procjena uspješnosti i optimizacija bioloških postupaka obrade predobrađenih otpadnih lignoceluloznih sirovina pomoću odabranih komercijalnih enzimskih pripravaka

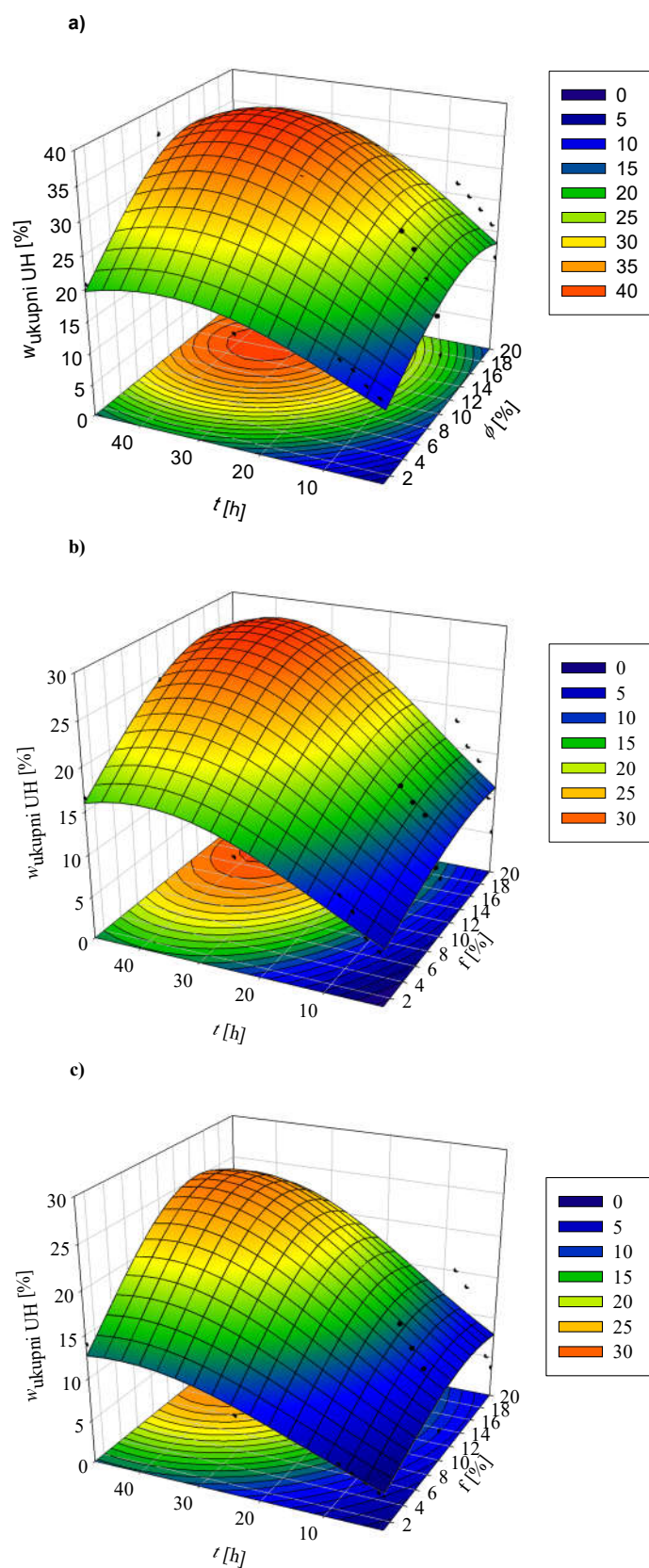
U ovom poglavlju prikazani su rezultati uspješnosti enzimske hidrolize čvrstog djela zaostalog nakon slabo kisele predobrade kukuruznih oklasaka pomoću komercijalnih enzima, točnije Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend u ovisnosti o vremenu. Postupak enzimske hidrolize opisan je u Poglavlju 3.2.2..

Korišteni su različiti volumni udjeli (vol vol^{-1}) navedenih enzima od 1%, 10% i 20% te različite koncentracije supstrata za enzimsku hidrolizu od 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} i 40 g L^{-1} (Slika 21-23).

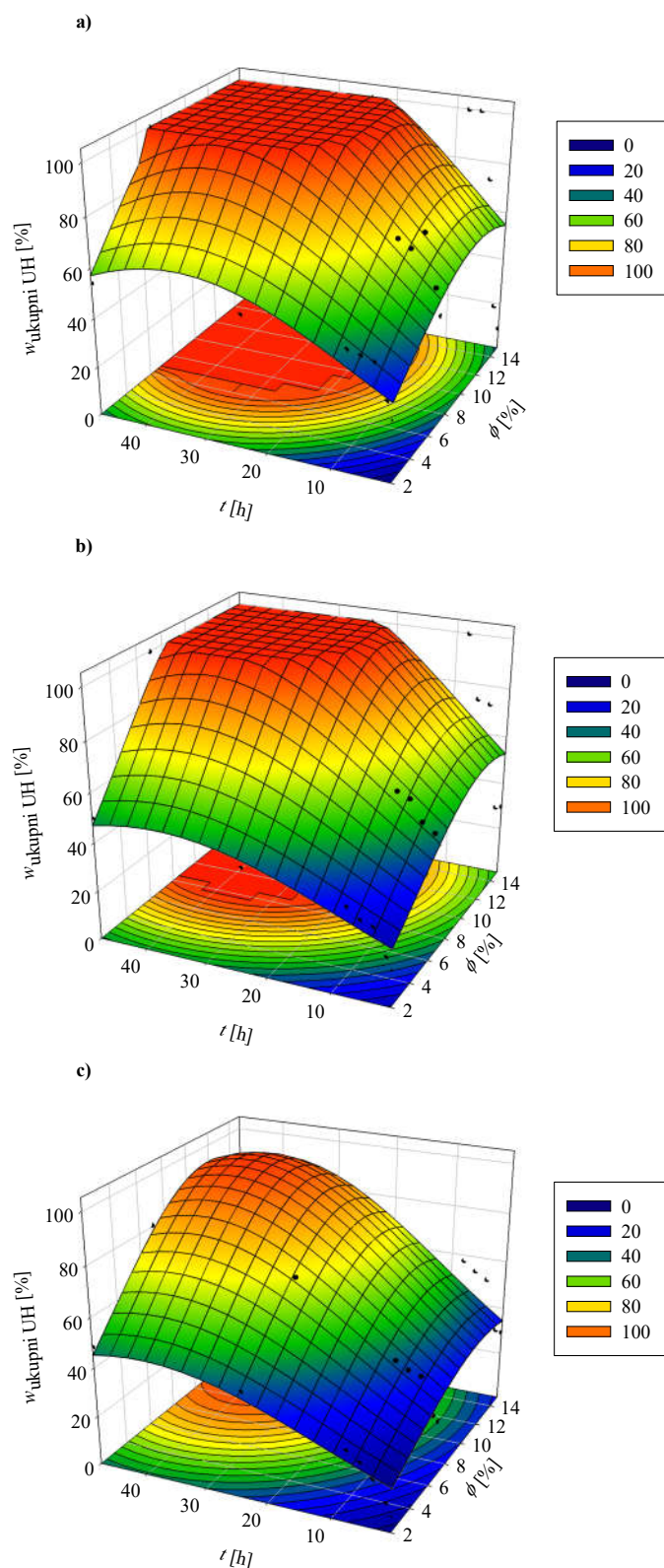
Provedeni eksperimenti korišteni su za utvrđivanje najučinkovitije kombinacije koncentracije supstrata i enzima za provedbu uspješne enzimske hidrolize predobrađenih kukuruznih oklasaka (Tablica 12). Rezultati na Slici 24. prikazuju rezultate uspješnosti enzimske hidrolize kiselinski predobrađenih, ispranih i usitnjenih kukuruznih oklasaka u acetatnom puferu i u MHP korištenjem kombinacije komercijalnih enzima (2% vol vol^{-1} Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol^{-1} Viscozyme L) pri različitim temperaturama (20°C , 30°C , 40°C i 50°C) u ovisnosti o vremenu trajanja procesa hidrolize.



Slika 21. Ovisnost uspješnosti enzimske hidrolize čvrstog dijela zaostalog nakon blago kisele predobrade kukuruznih oklasaka provedene u acetatnom puferu s: a) 10 g L^{-1} ; b) 20 g L^{-1} ; c) 40 g L^{-1} supstrata o različitim volumnim udjelima Cellulase, enzyme blenda i vremenu trajanja hidrolize.



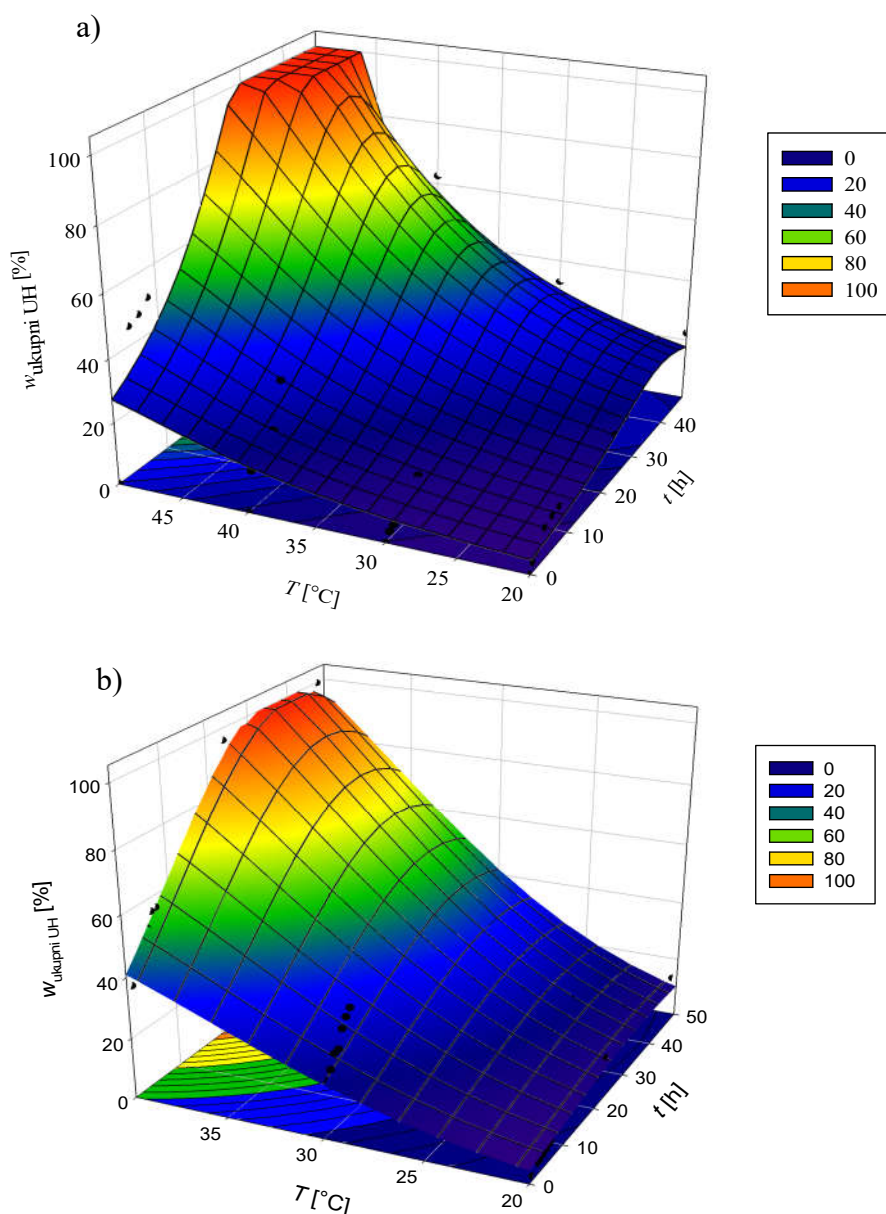
Slika 22. Ovisnost uspješnosti enzimske hidrolize čvrstog dijela zaostalog nakon blago kisele predobrade kukuruznih oklasaka provedene u acetatnom puferu s: a) 10 g L^{-1} ; b) 20 g L^{-1} ; c) 40 g L^{-1} supstrata o različitim volumnim udjelima Viscozyme L i vremenu trajanja hidrolize.



Slika 23. Ovisnost uspješnosti enzimske hidrolize čvrstog dijela zaostalog nakon blago kisele predobrade kukuruznih oklasaka provedene u acetatnom puferu s: a) 10 g L^{-1} ; b) 20 g L^{-1} ; c) 40 g L^{-1} supstrata o različitim volumnim udjelima Cellulase, enzyme blenda i Viscozyna L i vremenu trajanja hidrolize.

Tablica 12. Rezultati optimizacije procesa enzimske hidrolize s 40 g L⁻¹ PKO dobiveni koristeći programski paket DesignExpert.

	Vrijeme (h)	Cellulase, ezyme blend (vol vol ⁻¹)	Viscozyme (vol vol ⁻¹)	Prinos ugljikohidrata (%)
Cilj	U rasponu	U rasponu	U rasponu	Max
Važnost	-	3	3	5
Optimum	48	2	5,18	92,66



Slika 24. Ovisnost uspješnosti enzimske hidrolize 40 g L⁻¹ čvrstog dijela zaostalog nakon blago kisele predobrade kukuruznih oklasaka provedene u: a) acetatnom puferu; b) MHP; s optimalnom kombinacijom Cellulase blenda (2% vol vol⁻¹) i Viscozyma L (5,18% vol vol⁻¹) u ovisnosti o temperaturi i vremenu trajanja hidrolize.

4.1.3. Rezultati istraživanja uzgoja odabranih vrsta plijesni za procjenu lignocelulolitičke aktivnosti i proizvodnju lignocelulolitičkih enzima

Sinergističkim djelovanjem raznih enzima koji pripadaju složenom sustavu celulaza i hemicelulaza dolazi do pretvorbe celuloze i hemiceluloze u jednostavnije fermentabilne šećere. Preliminarna procjena lignocelulolitičke aktivnosti plijesni provedena je na Petrijevim pločama na CMC agaru obojanim kongo crvenilom (Poglavlje 3.2.3.). Sedam vrsta mikroorganizama koji su podvrgnuti ovom testu su: *M. indicus*, *P. variotii*, *M. thermophila*, *T. terrestris*, *B. dothidea*, *F. oxysporum f.sp. langenariae*, i *F. verticillioides*. Rezultati ovih preliminarnih uzgoja izraženi su kao EI vrijednosti (Poglavlje 3.2.3.) prikazane u Tablici 13.

S obzirom na preliminarne rezultate, sve plijesni su podvrgnute daljnjem ispitivanju lignocelulolitičke aktivnosti (Poglavlje 3.2.3.2.). Rezultati specifičnih aktivnosti škrob degradirajućih enzima, celulaza (endo i egzo-glukanaza), hemicelulaza (arabinaze, mananaze, ksilanaze i pektinaze), celobioza dehidrogenaze (CDH), lakaze i lignin peroksidaze (LiP) u ovisnosti o korištenoj plijesni i hranjivoj podlozi prikazani su na Slici 25.

Tablica 13. EI vrijednosti dobivene za pojedine plijesni nakon 5 dana uzgoja pri 30°C na CMC agaru s dodatkom sintetskog bojila kongo crvenila.

MO	<i>B. dothidea</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. oxysporum f.sp. langernariae</i>	<i>M. thermophila</i>	<i>M. indicus</i>	<i>P. variotii</i>	<i>T. terrestris</i>
EI	1,07	1,09	1,1	1,03	1,01	1,05	1,03

	Škrob degradirajući enzimi				Arabinazna aktivnost				Mananazna aktivnost				Ksilanazna aktivnost				Endo- glukanazna aktivnost				Egzo- glukanazna aktivnost				Pektinazna aktivnost			
	Hranjiva podloga																											
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>Botryosphaeria dothidea</i> JCM 2738	red	red	yellow	yellow	yellow	yellow	green	green	yellow	yellow	yellow	green	blue	blue	blue	dark blue	red	red	yellow	yellow	green	green	green	green	green	green	green	green
<i>Fusarium verticillioides</i> JCM 23107	red	yellow	yellow	green	yellow	green	yellow	blue	yellow	yellow	green	blue	dark blue	dark blue	dark blue	blue	red	yellow	yellow	green	green	green	green	blue	green	green	green	dark blue
<i>Fusarium oxysporum</i> JCM 9293	yellow	green	red	green	green	green	yellow	blue	green	green	yellow	blue	blue	blue	dark blue	blue	yellow	green	red	green	green	blue	green	green	blue	blue	yellow	blue
<i>Myceliophthora thermophila</i> CBS 663.74	red	red	red	yellow	red	yellow	green	green	yellow	yellow	yellow	yellow	green	green	yellow	green	red	red	red	red	yellow	yellow	yellow	yellow	green	yellow	yellow	green
<i>Mucor indicus</i> DSM 2185	red	red	red	red	red	red	red	yellow	yellow	green	yellow	yellow	yellow	yellow	red	red	red	red	red	red	red	red	red	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow
<i>Paecilomyces variotii</i> CBS 372.70	red	yellow	yellow	yellow	red	yellow	green	green	red	yellow	green	green	red	green	green	green	red	yellow	yellow	yellow	red	red	red	green	yellow	yellow	green	green
<i>Thielavia terrestris</i> CBS 456.75	red	red	green	yellow	red	yellow	green	yellow	red	yellow	green	green	red	yellow	green	green	red	yellow	green	red	red	red	green	yellow	red	green	green	green

	CDH				Lakaze				LiP			
	Hranjiva podloga											
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>Botryosphaeria dothidea</i> JCM 2738												
<i>Fusarium verticillioides</i> JCM 23107												
<i>Fusarium oxysporum</i> JCM 9293												
<i>Myceliophthora thermophila</i> CBS 663.74												
<i>Mucor indicus</i> DSM 2185												
<i>Paecilomyces variotii</i> CBS 372.70												
<i>Thielavia terrestris</i> CBS 456.75												

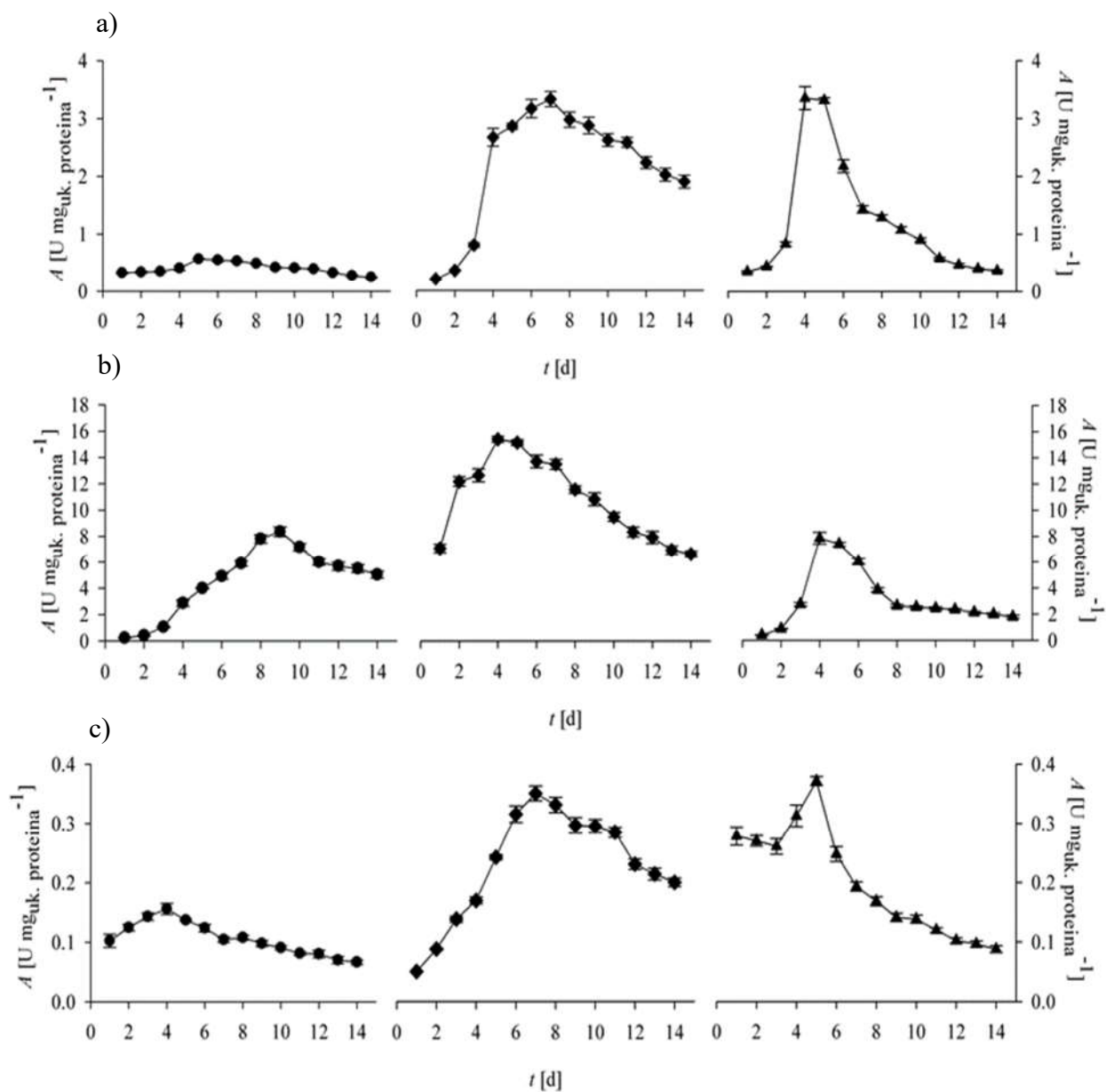
Legenda:	
Specifična aktivnost [U mg ⁻¹ _{uk. proteina}]:	
■ < 0.1	■ 0.1–0.2
■ 0.2–0.4	■ 0.4–0.6
■ 0.6–0.8	■ 0.8–1
■ 1–2	■ 2–4
■ > 4	

Slika 25. Specifična aktivnost pojedinih lignocelulolitičkih enzima različitih plijesni u ovisnosti o korištenoj hranjivoj podlozi nakon 96 sati uzgoja pri 30°C.

4.1.3.1. Kombinirana redosljedna fermentacija čvrstog supstrata i submerzna fermentacija u svrhu proizvodnje lignocelulolitičkih enzima te njihova karakterizacija

Najvažniji enzimi u razgradnji celuloze i hemiceluloze su endo- i egzoglukanaze i ksilanaze. Specifične aktivnosti ovih enzima praćene su tijekom uzgoja *F. oxysporum* f.sp. *langernariae* JCM 9293 (FO), *F. verticillioides* JCM 23107 (FV) i miješane kulture ovih dviju plijesni uz kukuruzne oklaske kao stimulator proizvodnje enzima tijekom 14 dana, pri 30°C u aerobnim uvjetima na tresilici brzine 200 o min⁻¹ (Poglavlje 3.2.3.2.). Rezultati su prikazani na Slici 26.

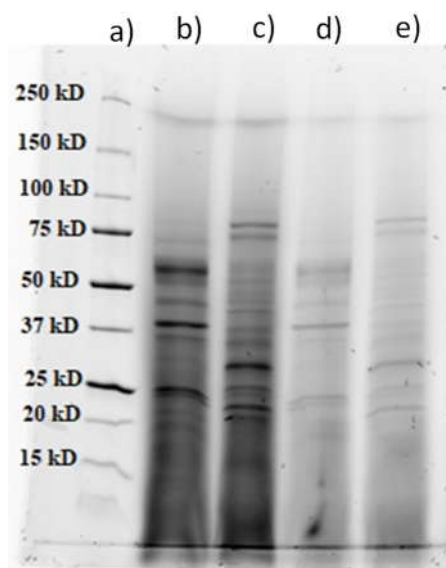
S obzirom na rezultate uzgoja, primijećeno je da su maksimalne enzimске aktivnosti postignute nakon 6 dana te su stoga uzgoji ponovljeni te zaustavljeni nakon 6 dana. Uzorci su koncentrirani i djelomično pročišćeni te im je određena specifična enzimska aktivnost (Tablica 14), ovi uzorci su ujedno podvrgnuti i SDS-PAGE elektroforezi (Slika 27) te LC-ESI-MS analizi (Poglavlje 3.2.3.3.).



Slika 26. Promjena specifične enzimске aktivnosti: a) egzoglukanazna; b) endoglukanazna; c) ksilanazna, tijekom kombinirane redosljedne fermentacije čvrstog supstrata i submerzne fermentacije: ● FV; ■ FO.; ▲ Miješana kultura, u aerobnim uvjetima pri 30°C i 200 o min⁻¹.

Tablica 14. Specifična enzimska aktivnost nepročišćenog i djelomično pročišćenog ekstrakta plijesni *Fusarium* sp.

	γ_{proteina} (mg mL ⁻¹)	Ukupni volumen (mL)	Enzimska aktivnost (U mg ⁻¹ _{uk. proteina})						
			Škrob degradirajuća	Endo- i egzo- arabinaza	Mananaza	Ksilanaza	Endo-glukanaza	Egzo-glukanaza	Pektinaza
<i>FV</i> ekstrakt	0,41±0,03	980±23	0,42±0,08	0,58±0,07	0,53±0,06	14,48±0,12	0,21±0,01	0,57±0,01	1,022±0,08
<i>FV</i> djelomično pročišćeni ekstrakt	0,89±0,09	132±8,4	0,91±0,09	1,11±0,10	1,75±0,10	25,12±0,25	0,55±0,09	0,91±0,07	4,45±0,11
<i>FO</i> ekstrakt	0,33±0,02	965±37	0,76±0,07	0,36±0,04	0,62±0,05	6,44±0,18	0,34±0,02	4,09±0,01	0,79±0,09
<i>FO</i> djelomično pročišćeni ekstrakt	0,61±0,05	120±5,6	1,09±0,09	0,94±0,07	1,47±0,10	11,05±0,14	1,09±0,05	7,85±0,18	2,93±0,23



Slika 27. SDS-PAGE analiza: a) Precision Plus Protein Standard, b) djelomično pročišćeni ekstrakt FO, c) djelomično pročišćeni ekstrakt FV, d) nepročišćeni ekstrakt FO, e) nepročišćeni ekstrakt FV.

4.2. Optimizacija uzgoja odabranih vrsta mikroorganizama (kvasca *S. cerevisiae* Y9, plijesni *M. indicus* DSM 2185 i bakterije *R. adriaticum* DSM 2781) za proizvodnju biogoriva i biokemikalija

U ovom poglavlju prikazani su rezultati istraživanja uzgoja kvasca *S. cerevisiae* Y9 i plijesni *M. indicus* na podlogama koje su kao izvor ugljika sadržavale glukozu, ksilozu te kombinaciju glukoze i ksiloze u aerobnim i anaerobnim uvjetima (Poglavlje 3.2.4.3.). Rezultati ovih eksperimenata prikazani su u podpoglavlju 4.2.1. Promjena koncentracije supstrata i produkata detektiranih tijekom uzgoja prikazani su na Slici 28. i Slici 29., dok su parametri uspješnosti procesa dani u Tablici 15.

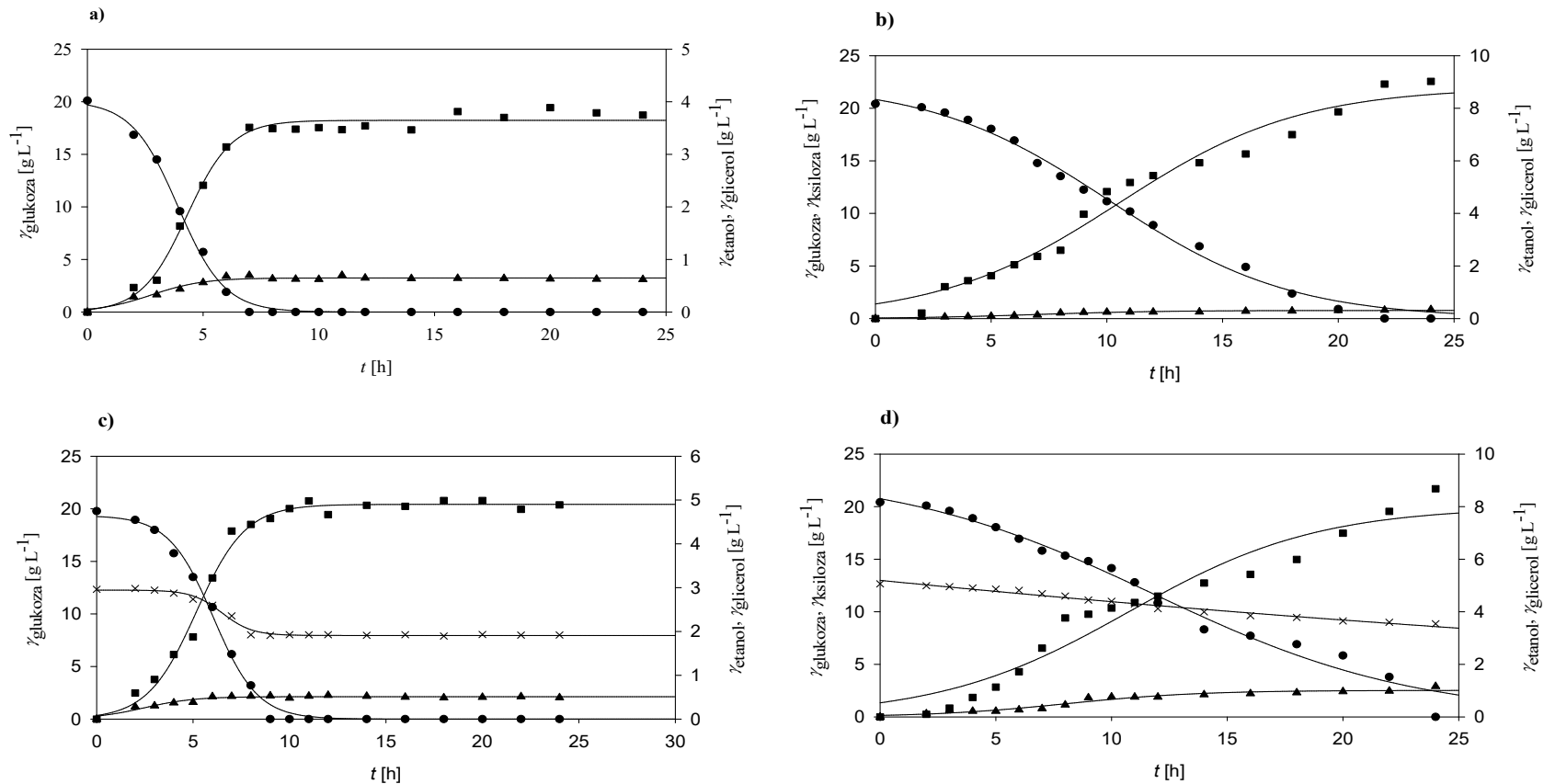
Podpoglavlje 4.2.2. sadržava rezultate uzgoja plijesni *M. indicus* u podlozi s glukozom i različitim izvorima dušika (anorganske soli, kvašćev ekstrakt, mesni ekstrakt, pepton i CSL) s ciljem odabira najpogodnijeg izvora dušika kako bi se pronašla zadovoljavajuća i jeftinija alternativa za relativno skup kvašćev ekstrakt (Poglavlje 3.2.4.4.). Rezultati su prikazani u Tablicama 16-19.

U sljedećem podpoglavlju 4.2.3. prikazani su rezultati provedenih uzgoja na BKHKO i DBKHKO sa i bez dodatka izvora dušika s ciljem dobivanja etanola i masnih kiselina (Poglavlje 3.2.4.5.). Detektirane promjene koncentracija supstrata i produkata prikazane su na Slikama 30-33, a parametri uspješnosti navedenih procesa vidljivi su u Tablici 20. Isto potpoglavlje sadržava i rezultate utjecaja različitih izvora dušika na profil masnih kiselina izoliranih iz biomase plijesni *M. indicus* (4.2.3.1. i 4.2.3.2.). Profili masnih kiselina prikazani su u Tablicama 21-23.

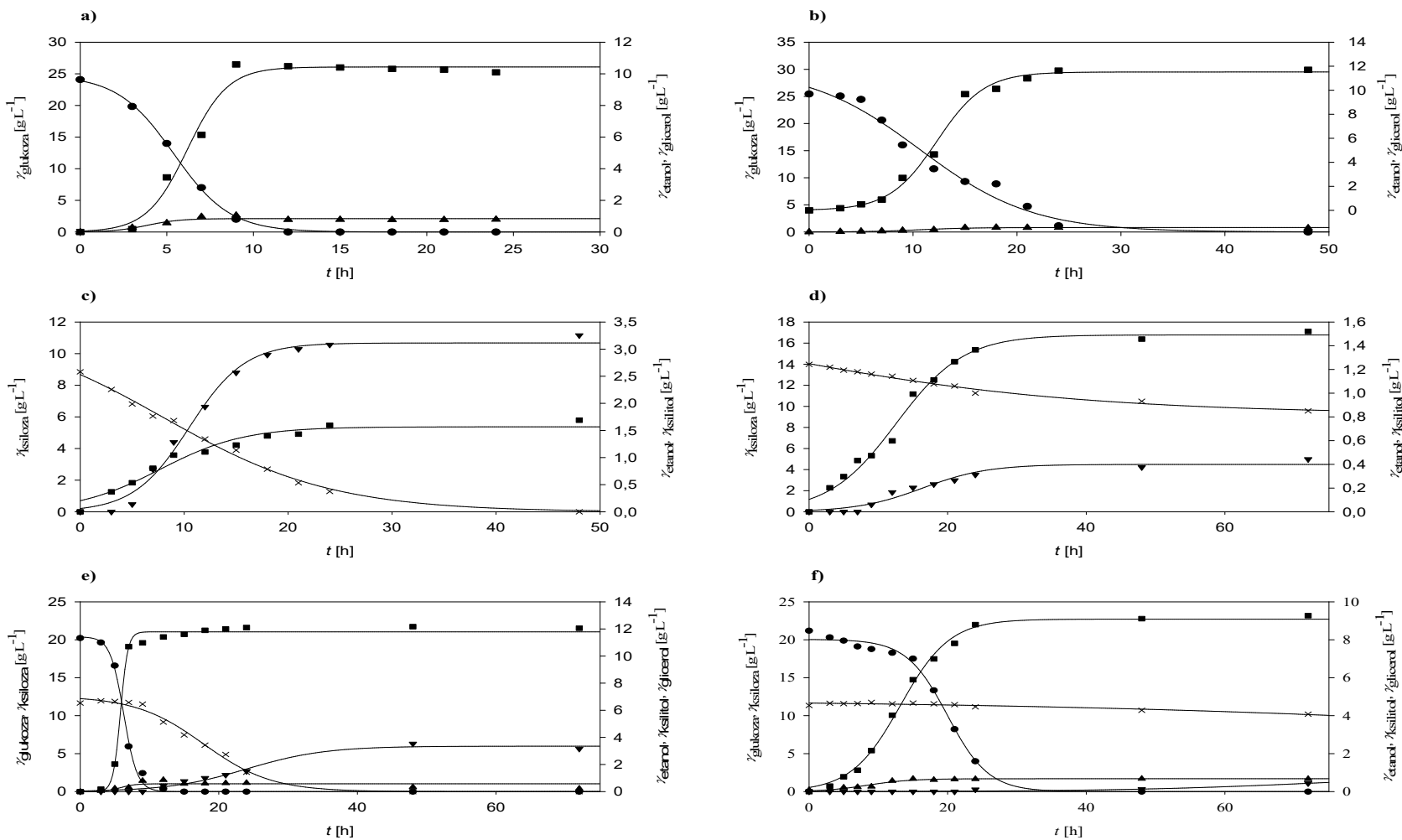
Potpoglavlje 4.2.4. sadrži rezultate uzgoja bakterije *R. adriaticum*. TOHP dobiveni nakon uzgoja plijesni *M. indicus* na BKHKO i DBKHKO korišteni su kao hranjive podloge za proizvodnju biomase i pigmenata (Slika 34) bakterije *R. adriaticum* (Poglavlje 3.2.4.6.).

Nadalje, u potpoglavlju 4.2.5. opisani su rezultati simultane saharifikacije i fermentacije plijesni *M. indicus* na PKO u aerobnim uvjetima u dva različita medija, puferu i MHP uz dodatak 2% Cellulase, enzyme blenda i 5,18% Viscozyma (Poglavlje 3.2.4.7.). Uzgoji su provedeni pri tri različite temperature (20°C, 30°C, 40°C). Promjene koncentracije supstrata i produkata tijekom ovih uzgoja prikazani su na Slikama 35-36., dok su parametri uspješnosti u Tablici 24.

4.2.1. Rezultati uzgoja kvasca *S. cerevisiae* Y9 i plijesni *M. indicus* DSM 2185 u svrhu optimizacije procesa proizvodnje biogoriva i biokemikalija



Slika 28. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (×), glicerola (▲) i etanola (■) tijekom uzgoja kvasca *S. cerevisiae* Y9 u Erlenmeyerovim tikvicama na podlogama s: a) glukozom u aerobnim uvjetima; b) glukozom u anaerobnim uvjetima; c) glukozom i ksilozom u aerobnim uvjetima; d) glukozom i ksilozom u anaerobnim uvjetima na 30°C.



Slika 29. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (×), glicerola (▲), ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* u Erlenmeyerovim tikvicama na podlogama s: a) glukozom u aerobnim uvjetima; b) glukozom u anaerobnim uvjetima; c) ksilozom u aerobnim uvjetima; d) ksilozom u anaerobnim uvjetima; e) glukozom i ksilozom u aerobnim uvjetima; f) glukozom i ksilozom u anaerobnim uvjetima na 30°C.

Tablica 15. Trajanje lag faze rasta i kinetički parametri rasta kvasca *S. cerevisiae* Y9 (Y9) i plijesni *M. indicus* (MI) na različitim hranjivim podlogama u Erlenmeyerovim tikvicama pri pH=5,5, n=200 o min⁻¹, T=30°C.

MO + izvor C	uvjeti	t _{lag} (h)	t _{exp} (h)	r _{glc} (h ⁻¹)	r _{ksi} (h ⁻¹)	r _{glc} (h ⁻¹)	r _{xoh} (h ⁻¹)	r _{etoh} (h ⁻¹)	Y _{x/s} (g g ⁻¹)	Y _{glc/s} (g g ⁻¹)	Y _{xoh/s} (g g ⁻¹)	Y _{etoh/s} (g g ⁻¹)	Pr _{xoh max} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Pr _{xoh uk.} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Pr _{etoh max} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Pr _{etoh uk.} (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Y9 + glc	A	2,00	5,00	0,47	0,00	0,22	0,00	0,39	0,17	0,03	0,00	0,19	0,00	0,00	0,50	0,16
Y9 + glc	AN	3,00	15,00	0,10	0,00	0,16	0,00	0,17	0,10	0,04	0,00	0,44	0,00	0,00	0,64	0,38
Y9 + glc, ksi	A	2,00	5,00	0,14	0,10	0,04	0,00	0,33	0,13	0,02	0,00	0,20	0,00	0,00	0,55	0,20
Y9 + glc, ksi	AN	3,00	15,00	0,05	0,02	0,12	0,00	0,41	0,09	0,05	0,00	0,36	0,00	0,00	0,62	0,36
MI + glc	A	3,00	6,00	0,25	0,00	0,31	0,00	0,28	0,22	0,03	0,00	0,42	0,00	0,00	1,18	0,42
MI + glc	AN	5,00	13,00	0,01	0,00	0,21	0,00	0,33	0,09	0,03	0,00	0,46	0,00	0,00	0,56	0,24
MI + ksi.	A	3,00	6,00	0,00	0,25	0,31	0,09	0,28	0,19	0,00	0,37	0,18	0,07	0,07	0,12	0,07
MI + ksi	AN	5,00	21,00	0,00	0,01	0,00	0,05	0,13	0,01	0,00	0,03	0,11	0,01	0,01	0,02	0,02
MI + glc, ksi	A	2,00	6,00	0,53	0,01	0,44	0,08	1,03	0,29	0,01	0,27	0,38	0,08	0,07	0,27	0,17
MI + glc, ksi	AN	5,00	16,00	0,03	0,00	0,14	0,02	0,20	0,11	0,03	0,04	0,41	0,01	0,01	0,14	0,13

*Y9 – *Saccharomyces cerevisiae* Y9; MI - *Mucor indicus*, Glc - glukoza; Ksi - ksiloza; A- aerobni uvjeti uzgoja; AN- anaerobni uvjeti uzgoja.

4.2.2. Optimizacija uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 na podlogama s različitim izvorima dušika te glukozom kao izvorom ugljika u aerobnim uvjetima

Tablica 16. Trajanje lag faze rasta i kinetički parametri rasta plijesni *M. indicus* u hranjivoj podlozi s glukozom i različitim koncentracijama CSL-a u Erlenmeyerovim tikvicama pri pH=5,5; n=200 o min⁻¹; T=30°C.

γ_{CSL} (g L ⁻¹)	t_{lag} (h)	γ_{S0} (g L ⁻¹)	γ_{S48h} (g L ⁻¹)	γ_{x48h} (g L ⁻¹)	γ_{glic48h} (g L ⁻¹)	γ_{etoh48h} (g L ⁻¹)	$Y_{\text{x/s}}$ (g g ⁻¹)	$Y_{\text{glic/s}}$ (g g ⁻¹)	$Y_{\text{etoh/s}}$ (g g ⁻¹)	E_{etoh} (%)	$Pr_{\text{etoh uk.}}$ (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1	3	20,15	12,00	1,60	0,17	2,79	0,20	0,02	0,34	67,07	0,06
2	3	20,62	0,76	3,41	0,21	6,01	0,17	0,01	0,30	59,29	0,13
4	3	20,96	0,11	3,28	0,19	6,15	0,16	0,01	0,29	57,79	0,13
5	3	20,85	0,00	3,64	0,24	7,30	0,18	0,01	0,35	69,17	0,15
7	3	19,11	0,00	3,77	0,28	7,23	0,20	0,01	0,38	73,61	0,15
9	3	20,09	0,00	4,29	0,24	7,03	0,21	0,01	0,33	64,47	0,14
10	3	20,36	0,00	4,79	0,23	6,42	0,24	0,01	0,24	47,73	0,13

Tablica 17. Trajanje lag faze rasta i kinetički parametri rasta plijesni *M. indicus* u hranjivoj podlozi s glukozom i različitim koncentracijama mesnog ekstrakta (ME) u Erlenmeyerovim tikvicama pri pH=5,5; n=200 o min⁻¹; T=30°C.

γ_{ME} (g L ⁻¹)	t_{lag} (h)	γ_{S0} (g L ⁻¹)	γ_{S48h} (g L ⁻¹)	γ_{x48h} (g L ⁻¹)	γ_{glic48h} (g L ⁻¹)	γ_{etoh48h} (g L ⁻¹)	$Y_{\text{x/s}}$ (g g ⁻¹)	$Y_{\text{glic/s}}$ (g g ⁻¹)	$Y_{\text{etoh/s}}$ (g g ⁻¹)	E_{etoh} (%)	$Pr_{\text{etoh uk.}}$ (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1	2	20,55	16,98	2,39	0,06	0,22	0,67	0,02	0,06	12,02	0,00
2	2	20,99	15,12	2,41	0,12	0,87	0,41	0,02	0,15	29,10	0,02
4	2	20,92	0,56	3,91	0,15	5,39	0,19	0,01	0,26	51,92	0,11
5	2	19,74	0,00	4,02	0,95	5,00	0,20	0,05	0,25	49,64	0,10
7	2	19,41	0,00	4,67	0,71	5,97	0,24	0,04	0,31	60,31	0,12
9	2	20,73	0,00	4,77	1,10	5,68	0,23	0,05	0,27	53,75	0,12
10	2	21,63	0,00	4,68	0,68	7,50	0,22	0,03	0,35	68,00	0,16

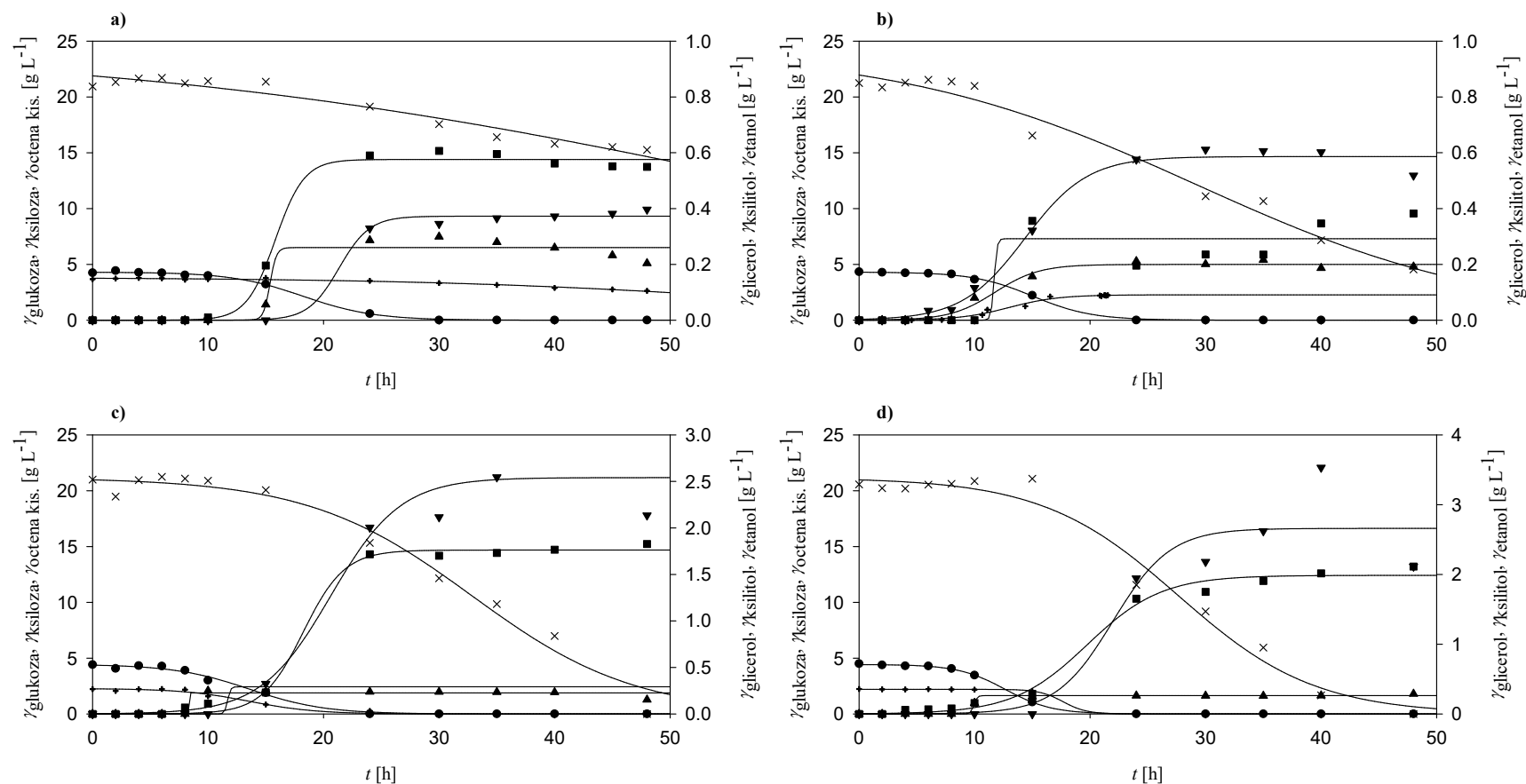
Tablica 18. Trajanje lag faze rasta i kinetički parametri rasta plijesni *M. indicus* u hranjivoj podlozi s glukozom i različitim koncentracijama peptona (PE) u Erlenmeyerovim tikvicama pri pH=5,5; n=200 o min⁻¹; T=30°C.

γ_{PE} (g L ⁻¹)	t_{lag} (h)	γ_{S0} (g L ⁻¹)	γ_{S48h} (g L ⁻¹)	γ_{x48h} (g L ⁻¹)	$\gamma_{glic48h}$ (g L ⁻¹)	$\gamma_{etoh48h}$ (g L ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{glic/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{etoh/s}$ (g g ⁻¹)	E_{etoh} (%)	$Pr_{etoh uk.}$ (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1	2	24,36	13,58	0,90	0,21	0,74	0,08	0,02	0,07	13,39	0,02
2	2	23,22	13,02	1,02	0,21	0,70	0,10	0,02	0,07	13,51	0,01
4	2	23,00	12,35	1,85	0,20	0,72	0,17	0,02	0,07	13,31	0,02
5	2	24,69	10,21	2,00	0,23	0,69	0,14	0,02	0,05	9,34	0,01
7	2	24,12	9,89	2,26	0,23	0,76	0,16	0,02	0,05	10,42	0,02
9	2	23,46	9,02	2,66	0,27	0,81	0,18	0,02	0,06	11,03	0,02
10	2	23,88	8,58	3,03	0,26	0,83	0,20	0,02	0,05	10,59	0,02

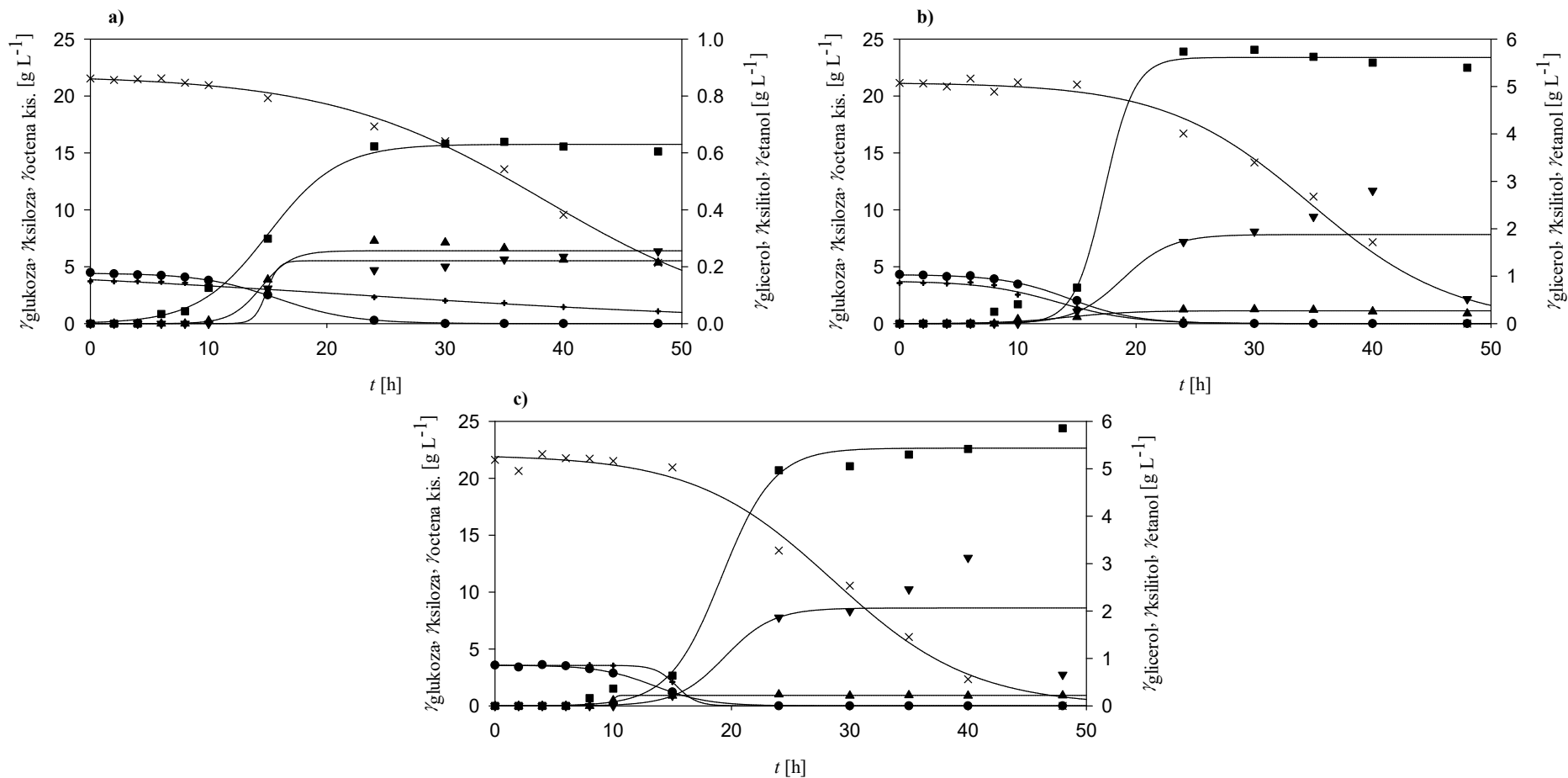
Tablica 19. Trajanje lag faze rasta i kinetički parametri rasta plijesni *M. indicus* u hranjivoj podlozi s glukozom i različitim koncentracijama kvašćevog ekstrakta (KE) u Erlenmeyerovim tikvicama pri pH=5,5; n=200 o min⁻¹; T=30°C.

γ_{KE} (g L ⁻¹)	t_{lag} (h)	γ_{S0} (g L ⁻¹)	γ_{S48h} (g L ⁻¹)	γ_{x48h} (g L ⁻¹)	$\gamma_{glic48h}$ (g L ⁻¹)	$\gamma_{etoh48h}$ (g L ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{glic/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{etoh/s}$ (g g ⁻¹)	E_{etoh} (%)	$Pr_{etoh uk.}$ (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1	2	25,78	13,10	1,02	0,11	0,43	0,08	0,01	0,03	6,68	0,01
2	2	24,68	12,06	1,33	0,11	0,41	0,11	0,01	0,03	6,29	0,01
4	2	25,11	3,46	2,02	0,09	0,49	0,09	0,00	0,02	4,43	0,01
5	2	24,15	1,54	2,40	0,11	0,50	0,11	0,00	0,02	4,35	0,01
7	2	23,99	0,00	2,96	0,16	0,76	0,12	0,01	0,03	6,18	0,02
9	2	25,15	0,00	3,21	0,20	1,02	0,13	0,01	0,04	7,96	0,02
10	2	24,00	0,00	3,82	0,23	1,53	0,16	0,01	0,06	12,48	0,03

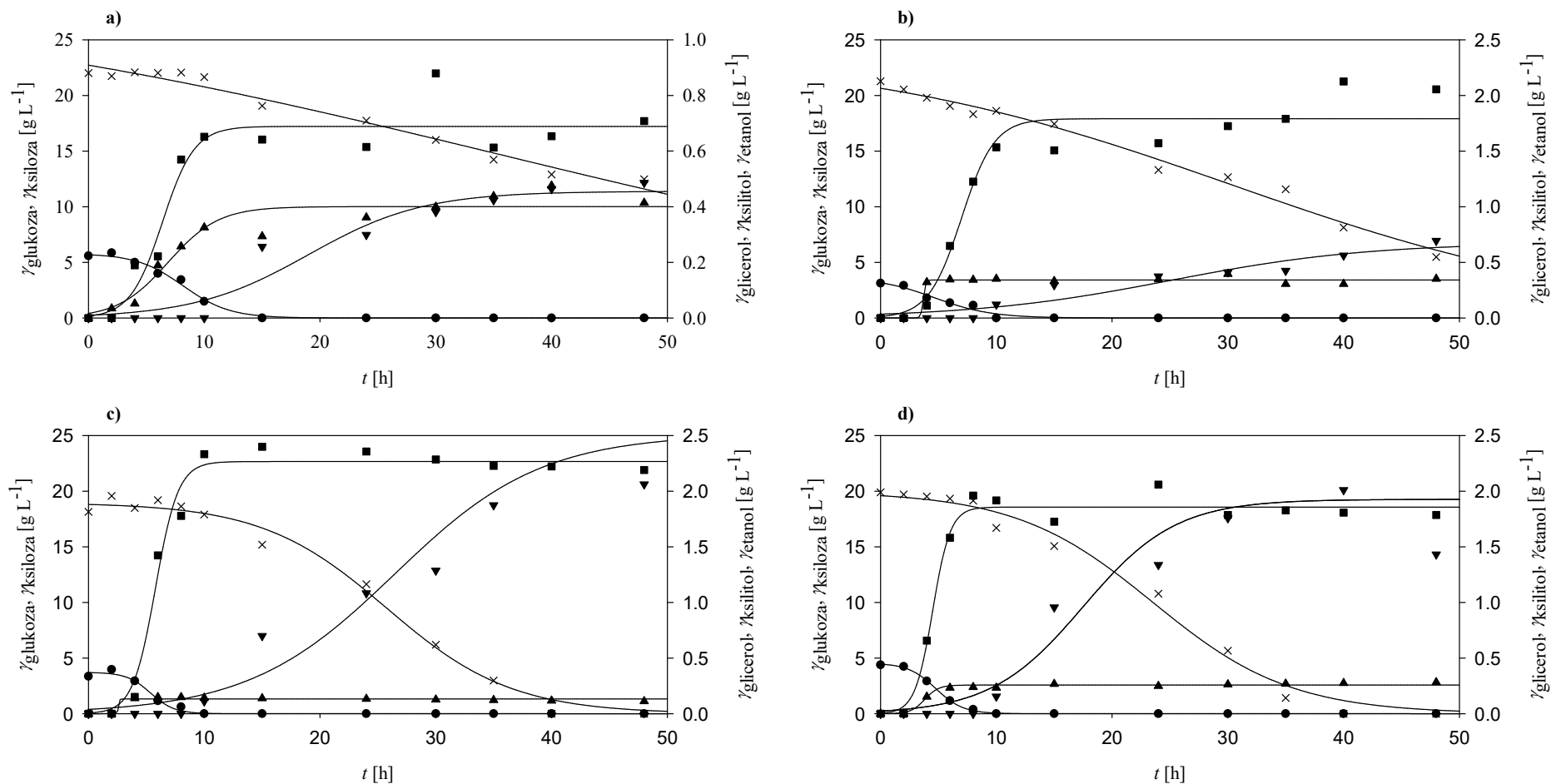
4.2.3. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na predbrađenom hidrolizatu kukuruznih oklasaka i različitim izvorima dušika



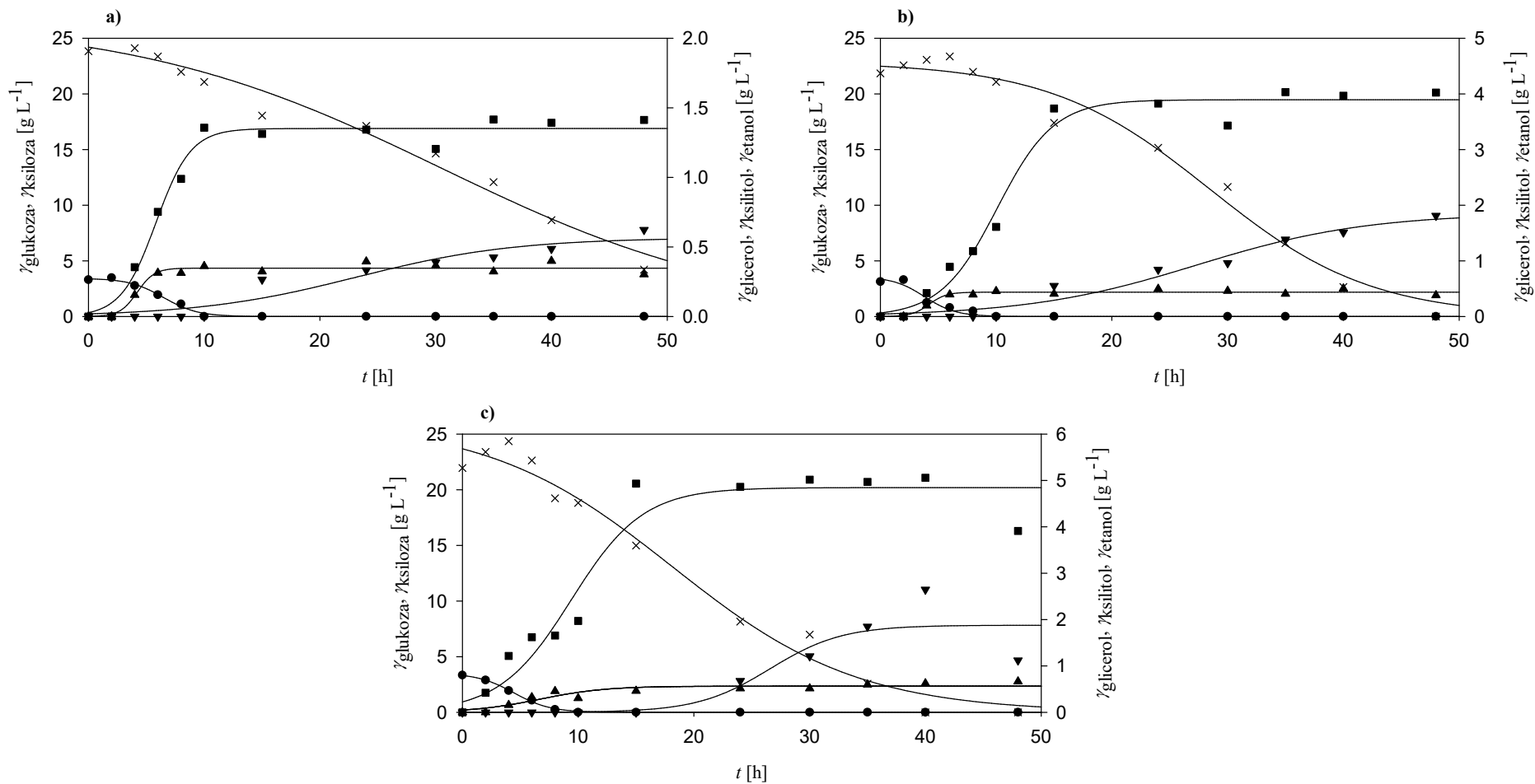
Slika 30. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (×); octene kiseline (+); glicerola (▲); ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom aerobnog uzgoja plijesni *M. indicus* u Erlenmeyerovim tikvicama na podlogama s: a) BKHKO; b) BKHKO uz dodatak 1 g L^{-1} KE; c) BKHKO uz dodatak 5 g L^{-1} KE; d) BKHKO uz dodatak 10 g L^{-1} KE; na tresilici (200 o min^{-1}) na 30°C .



Slika 31. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (×); octene kiseline (+); glicerola (▲); ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom aerobnog uzgoja plijesni *M. indicus* u Erlenmeyerovim tikvicama na podlogama s: a) BKHKO uz dodatak 1 g L⁻¹ CSL; b) BKHKO uz dodatak 5 g L⁻¹ CSL; c) BKHKO uz dodatak 10 g L⁻¹ CSL; na tresilici (200 o min⁻¹) na 30°C.



Slika 32. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (x); octene kiseline (+); glicerola (▲); ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom aerobnog uzgoja plijesni *M. indicus* u Erlenmeyerovim tikvicama na podlogama s: a) DBKHKO; b) DBKHKO uz dodatak 1 g L⁻¹ KE; c) DBKHKO uz dodatak 5 g L⁻¹ KE; d) DBKHKO uz dodatak 10 g L⁻¹ KE; na tresilici (200 o min⁻¹) na 30°C.



Slika 33. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (×); glicerola (▲); ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom aerobnog uzgoja plijesni *M. indicus* u Erlenmeyerovim tikvicama na podlogama s: a) DBKHKO uz dodatak 1 g L⁻¹ CSL; b) DBKHKO uz dodatak 5 g L⁻¹ CSL; c) DBKHKO uz dodatak 10 g L⁻¹ CSL; na tresilici (200 o min⁻¹) na 30°C.

Tablica 20. Trajanje lag faze rasta i kinetički parametri rasta plijesni *M. indicus* na hranjivim podlogama s obojenim (sirovim) (H) i neobojenim (DH) blago kiselinskim hidrolizatom kukuruznih oklasaka i različitim koncentracijama izvora dušika (KE i CSL) u Erlenmeyerovim tikvicama pri pH=5,5; n=200 o min⁻¹; T=30°C.

podloga	t _{lag} (h)	r _{glc} (h ⁻¹)	r _{ksi} (h ⁻¹)	r _{octena} (h ⁻¹)	r _{glic} (h ⁻¹)	r _{xoh} (h ⁻¹)	r _{etoh} (h ⁻¹)	γ _X (g L ⁻¹)	Y _{x/s} (g g ⁻¹)	Y _{glic/s} (g g ⁻¹)	Y _{xoh/s} (g g ⁻¹)	Y _{etoh/s} (g g ⁻¹)	E (%)	Pr _{etoh} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Pr _{xoh} (g L ⁻¹ h ⁻¹)
H	8	0,145	0,010	0,008	0,020	0,007	0,006	2,950	0,298	0,048	0,070	0,055	10,874	0,011	0,008
H+KE 1	8	0,091	0,027	0,055	0,008	0,028	0,289	3,576	0,170	0,044	0,023	0,025	4,837	0,011	0,008
H+KE 5	6	0,090	0,035	0,131	0,002	0,030	0,198	3,892	0,153	0,035	0,102	0,072	14,109	0,038	0,044
H+KE 10	6	0,165	0,063	0,006	0,002	0,048	0,100	3,844	0,153	0,064	0,103	0,084	16,534	0,044	0,044
H+CSL 1	6	0,072	0,014	0,030	0,017	0,026	0,164	3,281	0,159	0,048	0,016	0,029	5,734	0,013	0,005
H+CSL 5	6	0,085	0,030	0,149	0,031	0,099	0,193	4,050	0,159	0,049	0,025	0,212	41,562	0,112	0,011
H+CSL 10	4	0,050	0,063	0,064	0,028	0,111	0,089	3,878	0,154	0,062	0,031	0,232	45,576	0,122	0,014
DH	6	0,208	0,015	0,000	0,020	0,024	0,002	3,178	0,210	0,074	0,051	0,047	9,175	0,015	0,010
DH+KE 1	2	0,129	0,029	0,000	0,004	0,025	0,215	4,088	0,216	0,113	0,044	0,109	21,301	0,043	0,014
DH+KE 5	2	0,312	0,071	0,000	0,006	0,058	0,124	5,275	0,245	0,033	0,114	0,102	19,983	0,046	0,043
DH+KE 10	2	0,514	0,095	0,000	0,005	0,029	0,040	5,106	0,210	0,064	0,072	0,074	14,428	0,037	0,030
DH+CSL 1	2	0,183	0,022	0,000	0,007	0,024	0,215	5,362	0,234	0,092	0,032	0,062	12,086	0,029	0,013
DH+CSL 5	2	0,326	0,068	0,000	0,007	0,040	0,215	6,240	0,250	0,122	0,083	0,161	31,602	0,084	0,038
DH+CSL 10	2	0,424	0,089	0,000	0,020	0,085	0,049	6,768	0,268	0,199	0,051	0,155	30,337	0,081	0,023

4.2.3.1. Utjecaj izvora dušika na profil masnih kiselina u biomasi plijesni *M. indicus* DSM 2185 kultiviranoj na glukozi i različitim izvorima dušika

Tablica 21. Sastav masnih kiselina u biomasi plijesni *M. indicus* na kraju uzgoja na podlogama s glukozom i različitim izvorima dušika.

izvor dušika	γ_{PE} (g L ⁻¹)							γ_{KE} (g L ⁻¹)						
	1	2	4	5	7	9	10	1	2	4	5	7	9	10
FAME	FAME (mg g⁻¹ biomase)													
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6:0	0,00	0,00	0,00	4,50	0,00	0,00	4,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,94	5,21	3,47	5,11	6,98	8,49	7,72
C10:0	8,93	2,38	1,62	2,18	17,90	14,76	4,31	2,81	2,97	1,98	2,77	7,48	9,1	8,28
C11:0	5,03	1,08	4,57	4,24	5,27	3,76	3,80	4,48	4,73	3,15	4,52	5,7	6,94	6,31
C12:0	8,61	1,91	1,85	4,01	2,17	1,49	3,38	5,04	5,32	3,54	5,23	3,76	4,57	4,16
C14:0	13,36	10,03	7,97	8,87	10,26	5,30	6,80	5,95	6,28	4,18	5,63	4,01	4,88	4,44
C15:0	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:0	13,83	11,71	16,96	12,30	7,26	18,53	74,50	10,51	16,15	7,64	10,62	7,26	8,97	8,01
C16:1 cis 9	0,53	0,56	6,61	2,01	1,59	0,64	2,79	0,92	0,97	0,64	0,13	2,08	2,53	2,3
C17:0	12,04	2,47	4,83	6,93	5,73	2,19	5,32	6,71	7,09	4,72	14,18	9,31	11,33	10,31
C17:1 cis 10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:0	38,09	41,82	29,13	88,19	10,98	4,71	68,84	55,06	58,15	38,7	7,99	71,93	7,56	7,64
C18:1 cis 9	84,40	70,06	64,30	66,41	24,29	24,50	55,87	37,74	45,47	46,81	77,36	45,49	7,12	6,08
C18:2 trans 9,12	7,73	5,72	3,33	7,48	2,49	1,45	7,46	9,91	10,46	6,96	9,25	21,97	26,74	24,32
C18:2 cis 9,12	88,29	42,95	20,93	106,28	4,49	4,05	61,76	87,82	92,75	61,72	44,35	45,76	55,71	50,67
C18:3 cis 6,9,12	14,71	17,08	14,83	36,99	17,35	13,55	74,09	51,33	59,82	66,35	117,24	64,3	78,27	71,19
C18:3 cis 9,12,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,46	5,43	4,94
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 cis 11,14,17	0,00	98,12	84,09	91,11	112,14	79,82	0,00	75,04	24,17	90,12	26,09	0,00	0,00	0,00
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,72	0,42	0,10	1,34	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,41	0,37
C24:1 cis 15	3,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,99	0,9
w (FAME) u biomasi (%)	30,0	30,63	26,12	38,2	22,23	17,47	11,76	35,82	33,95	33,98	33,05	30,49	23,9	21,76

Tablica 22. Sastav masnih kiselina u biomasi plijesni *M. indicus* na kraju uzgoja na podlogama s glukozom i različitim izvorima dušika (nastavak).

izvor dušika	γ_{CSL} (g L ⁻¹)							γ_{ME} (g L ⁻¹)						
	1	2	4	5	7	9	10	1	2	4	5	7	9	10
FAME	FAME (mg g⁻¹ biomase)													
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	24,22	0,00	0,00	0,00	21,85	0,00	0,00
C8:0	32,91	31,93	32,05	36,89	54,85	34,99	41,11	48,44	43,28	49,84	45,71	43,88	0,00	0,00
C10:0	10,37	11,24	19,66	12,83	17,38	11,1	12,98	0,00	13,68	15,78	14,42	13,84	0,00	0,00
C11:0	3,41	5,40	6,53	4,07	6,11	4,25	3,89	5,03	4,53	4,80	4,54	4,42	0,00	0,00
C12:0	1,27	2,00	2,64	1,65	2,72	1,71	1,61	1,95	1,76	2,12	1,80	1,67	0,00	0,00
C14:0	3,08	3,28	1,24	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	2,41	2,78	0,79	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:0	102,87	100,86	102,83	82,69	127,10	37,72	37,05	19,24	19,88	25,49	23,45	0,00	0,00	0,00
C16:1 cis 9	2,89	3,57	0,82	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C17:0	1,65	0,91	0,58	0,78	0,43	7,77	6,6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C17:1 cis 10	3,50	4,38	0,84	0,46	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:0	20,57	5,99	7,01	12,47	5,98	8,35	1,49	30,09	2,09	5,60	8,16	0,00	0,00	0,00
C18:1 cis 9	134,61	131,05	126,63	133,37	1,84	4,27	6,81	98,80	56,26	34,65	42,78	13,88	0,00	0,00
C18:2 trans 9,12	3,49	0,15	0,39	0,15	0,20	0,00	0,00	1,52	1,58	2,26	2,40	0,30	0,00	0,00
C18:2 cis 9,12	54,86	12,64	12,96	28,36	0,09	72,43	53,49	35,86	8,05	11,43	14,84	5,11	0,00	0,00
C18:3 cis 6,9,12	54,83	53,89	31,4	6,34	1,56	20,85	24,53	45,86	15,42	15,88	15,54	7,10	0,00	0,00
C18:3 cis 9,12,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	0,25	0,28	0,00	0,32	0,52	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 cis 11,14,17	1,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:1 cis 15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ukupni udio FAME u biomasi (%)	43,4	37,69	34,63	32,17	21,92	20,42	18,97	31,1	16,65	16,58	17,35	11,2	0	0

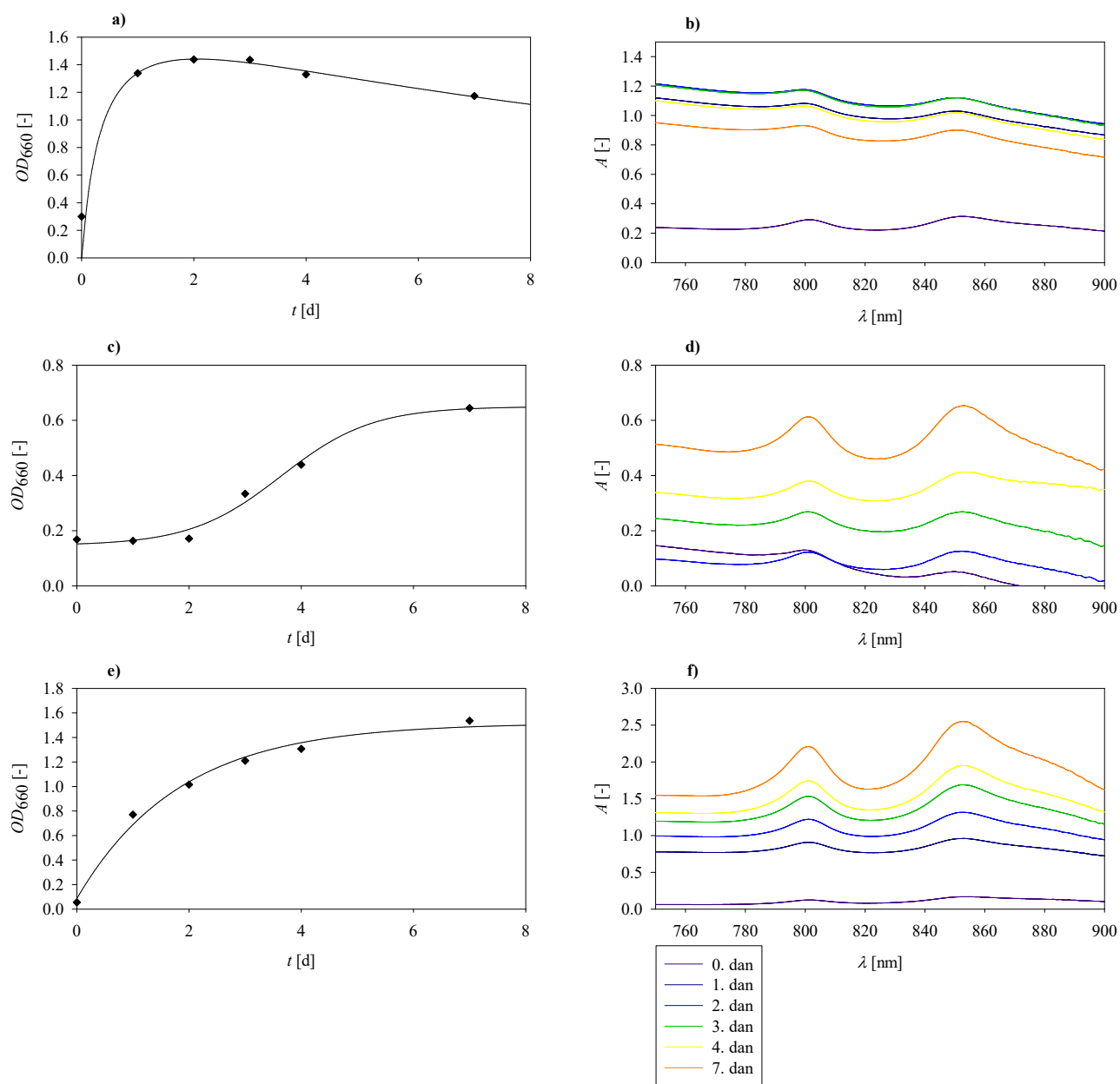
4.2.3.2. Utjecaj različitih izvora dušika na profil masnih kiselina u biomasi plijesni *M. indicus* DSM 2185 kultiviranoj na BKHKO i DBKHKO

podloga + izvor dušika	H	H KE 1	H KE 5	H KE 10	H CSL 1	H CSL 5	H CSL 10	DH	DH KE 1	DH KE 5	DH KE 10	DH CSL 1	DH CSL 5	DH CSL 10
FAME	FAME [mg g ⁻¹ biomase]													
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6:0	6,99	6,00	6,09	6,86	6,65	8,23	5,53	7,05	6,53	5,67	5,44	5,60	5,65	5,84
C8:0	0,00	4,98	0,00	5,58	0,00	3,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	30,99	0,00
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,78	0,00
C11:0	2,16	1,31	1,02	1,67	2,61	3,83	1,60	4,94	1,11	14,46	11,76	3,74	3,42	6,97
C12:0	1,79	1,72	0,00	0,00	2,05	2,88	1,42	1,39	1,31	2,03	1,24	1,08	1,39	1,06
C14:0	8,06	9,32	3,87	2,92	3,79	6,85	5,47	1,41	2,11	5,42	9,47	3,10	3,22	3,06
C14:1 cis 9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,14	7,77	9,01	0,90	0,41	0,00
C15:0	0,41	1,29	0,23	0,00	2,58	4,26	1,80	0,30	1,08	0,98	5,97	1,76	0,35	0,29
C15:1 cis 10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	1,40	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:0	52,88	0,00	41,07	24,85	11,70	18,69	24,36	45,76	33,68	28,18	25,61	44,86	69,46	41,18
C16:1 cis 9	11,17	15,20	5,04	2,45	19,88	6,03	5,73	3,30	3,78	3,46	3,94	7,07	0,36	21,16
C17:0	16,94	11,77	5,17	0,00	15,42	13,03	16,40	0,00	0,00	0,00	2,92	0,00	0,65	27,40
C17:1 cis 10	0,00	16,97	1,22	0,00	0,00	5,96	4,46	0,00	0,00	0,00	3,63	0,00	0,39	0,00
C18:0	78,13	3,28	5,17	0,00	5,57	3,66	2,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,48	0,00
C18:1 cis 9	81,96	71,33	143,62	103,19	108,86	112,37	114,62	136,83	146,47	109,79	105,05	122,93	112,03	108,08
C18:2 trans 9,12	61,18	67,87	49,66	38,41	95,28	76,66	60,74	41,93	38,85	41,14	23,59	43,09	48,13	33,36
C18:2 cis 9,12	46,78	59,65	26,88	23,94	58,77	66,10	46,14	18,74	23,25	37,17	31,29	25,33	23,82	17,91
C18:3 cis 6,9,12	23,32	62,03	21,17	25,29	37,35	30,71	20,79	40,89	45,51	42,27	21,39	48,17	52,23	42,41
C18:3 cis 9,12,15	0,00	33,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,00
C20:2 cis 11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,83	7,82
C20:3 cis 11,14,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,06	3,83
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,98	6,29
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,59	1,87
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,66	7,26
C24:1 cis 15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,30	5,21

w (FAME) u biomasi [%]	39,17	36,63	31,02	23,51	37,51	37,01	31,11	30,25	30,99	29,97	26,03	30,76	40,25	34,1
-------------------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------

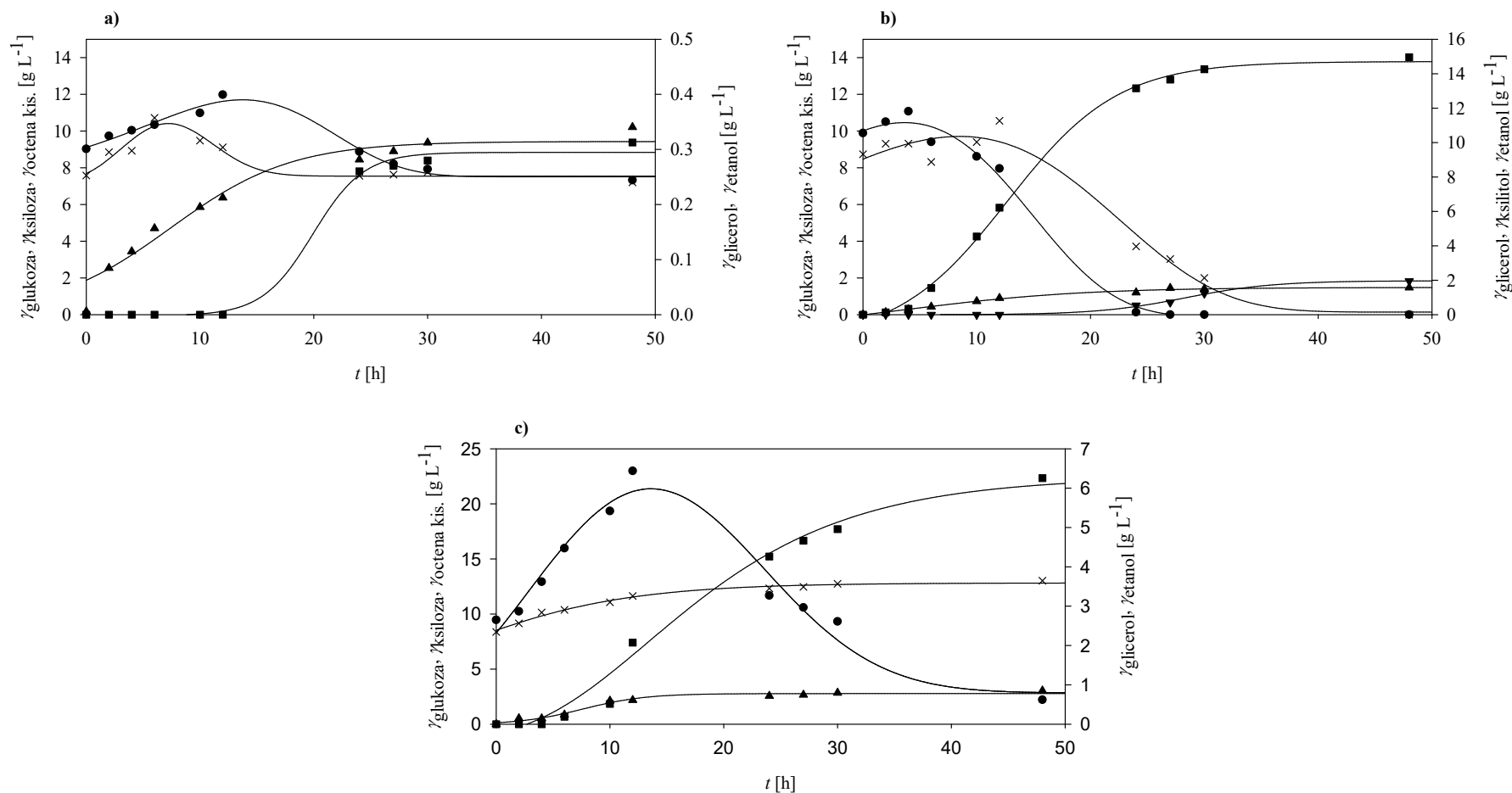
Tablica 23. Sastav masnih kiselina u biomasi plijesni *M. indicus* na kraju uzgoja na podlogama s obojenim (H) i neobojenim hidrolizatom (DH) KO i različitim izvorima dušika.

4.2.4. Rezultati uzgoja bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 na TOHP dobivenim nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 na kiselinskom hidrolizatu i dekoloriziranom kiselinskom hidrolizatu

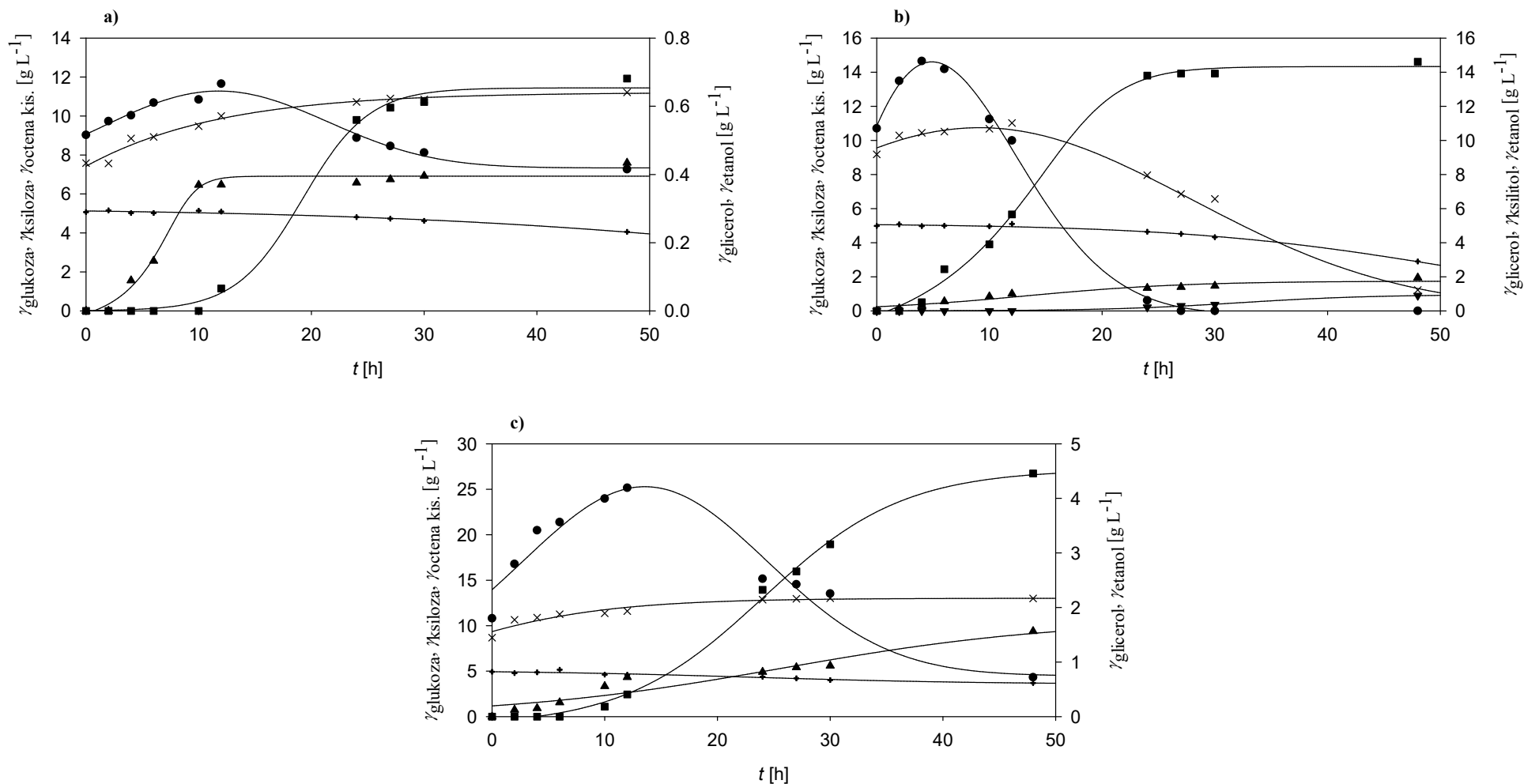


Slika 34. Promjena optičke gustoće i apsorbancije pigmenata tijekom 7 dana uzgoja bakterije *R. adriaticum* na: a,b) kontrola; te TOHP dobivenih nakon uzgoja *M. indicus*: c,d) otpadni hidrolizat; e,f) otpadni hidrolizat koji je sadržavao 5 g L⁻¹ CSL-a; pri 30°C, u mikroaerofilnim fototrofnim uvjetima.

4.2.5. Rezultati simultane saharifikacije i fermentacije PKO pomoću plijesni *M. indicus* DSM 2185



Slika 35. Promjena koncentracije glukoze (●), ksiloze (×), glicerola (▲), ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom simultane saharifikacije i fermentacije pomoću *M. indicus* u MHP uz dodatak 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L pri temperaturi od: a) 20°C; b) 30°C; c) 40°C; na tresilici (200 o min⁻¹) u aerobnim uvjetima.



Slika 36. Promjena koncentracije glukoze (●), ksiloze (×), glicerola (▲), ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom simultane saharifikacije i fermentacije pomoću *M. indicus* u acetatnom puferu uz dodatak 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L pri temperaturi od: a) 20°C; b) 30°C; c) 40°C; na tresilici (200 o min⁻¹) u aerobnim uvjetima.

Tablica 24. Parametri uspješnosti procesa simultane saharifikacije i fermentacije pomoću *Mucor indicus* uz dodatak 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L na različitim temperaturama i sastavu hranjive podloge.

Medij i temperatura	Y _{etoh/s max} (g g ⁻¹)	Y _{glic/s max} (g g ⁻¹)	Y _{xoh/s max} (g g ⁻¹)	Pr _{etoh} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Pr _{glic} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Pr _{xoh} (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Pufer 20°C	0,032	0,020	0,000	0,014	0,009	0,000
Pufer 30°C	0,376	0,050	0,101	0,304	0,041	0,019
Pufer 40°C	0,206	0,069	0,000	0,093	0,033	0,000
MHP 20°C	0,012	0,013	0,000	0,007	0,007	0,000
MHP 30°C	0,373	0,039	0,221	0,312	0,033	0,041
MHP 40°C	0,252	0,034	0,000	0,130	0,018	0,000

4.3. Rezultati optimizacije proizvodnje biogoriva i biokemikalija pomoću plijesni *M. indicus* DSM 2185 provedeni u različitim tipovima bioreaktora

Nakon provedenih preliminarnih eksperimenata odabrani radni mikroorganizam uzgajan je u bioreaktorima različitih konstrukcija pri optimalnim uvjetima bez pH regulacije. U potpoglavlju 4.3.1. prikazani su rezultati uzgoja plijesni *M. indicus* u reaktoru s miješalom. Slika 37. prikazuje rezultate uzgoja *M. indicus* na BKHKO dobivenom nakon kiselinskog predobrade kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru, dok Slika 38. prikazuje rezultate uzgoja ove iste plijesni na E-PKO (Poglavlje 3.2.5.1.).

Potpoglavlje 4.3.2. sadrži rezultate uzgoja plijesni *M. indicus* u barbotirajućoj koloni. Rezultati uzgoja na BKHKO prikazani su na Slici 39., a Slika 40. prikazuje rezultate uzgoja plijesni u istom bioreaktorskom sustavu na E-PKO (Poglavlje 3.2.5.2.).

U potpoglavlju 4.3.3. nalaze se rezultati uzgoja u HRCB-u. Tako Slika 41. prikazuje rezultate uzgoja *M. indicus* na BKHKO, dok Slika 42. prikazuje rezultate uzgoja na E-PKO (Poglavlje 3.2.5.3.).

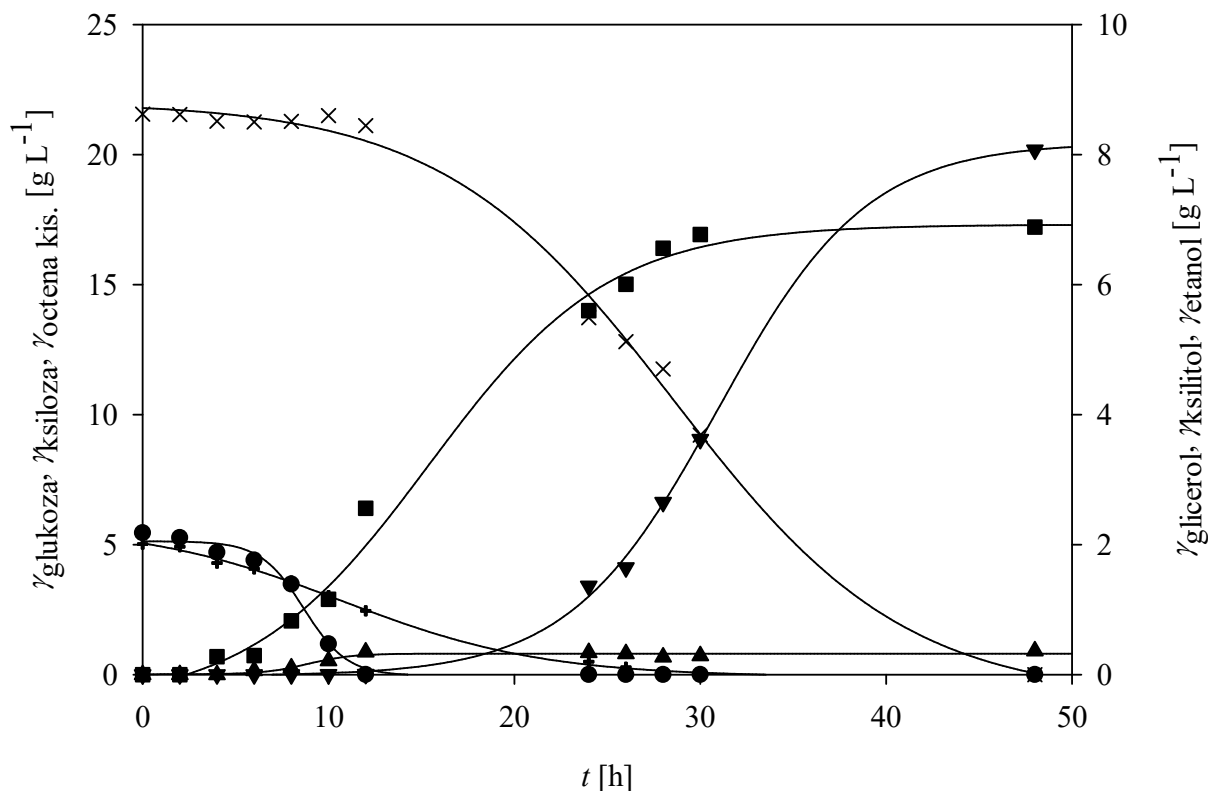
Tablica 25-26.. u potpoglavlju 4.3.4. prikazuje sumarne rezultate za sve navedene bioreaktorske sustave te prikazuje trajanje lag faze rasta i kinetičke parametre rasta plijesni *M. indicus*.

U potpoglavlju 4.3.5., Slika 44. prikazuje promjenu koncentracije supstrata i produkata tijekom uzgoja bakterije *R. adriaticum* na TOHP dobivenoj nakon uzgoja plijesni *M. indicus* u reaktoru s miješalom pri fototrofnim anaerobnim uvjetima, dok Slika 45. prikazuje promjenu optičke gustoće i apsorbancije pigmenata ove bakterije tijekom istog uzgoja (Poglavlje 3.2.5.5.).

Potpoglavlje 4.3.6. sadrži rezultate promjene koncentracije supstrata i produkata tijekom simultane saharifikacije i fermentacije u bioreaktoru s miješalom s predobrađenim kukuruznim oklascima kao sirovinom (Slika 43.)(Poglavlje 3.2.5.4.).

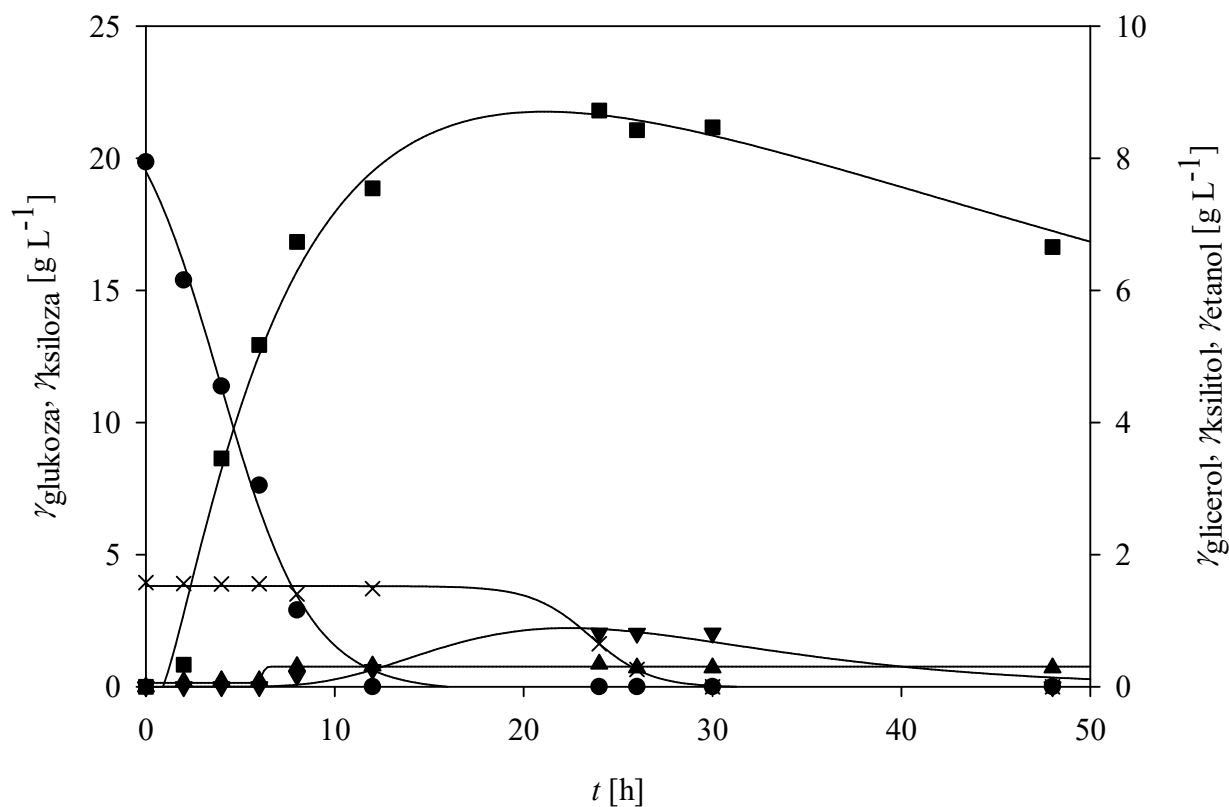
4.3.1. Rezultati uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom

4.3.1.1. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na BKHKO u bioreaktoru s miješalom



Slika 37. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (×); octene kiseline (+); glicerola (▲); ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom aerobnog uzgoja plijesni *M. indicus* u bioreaktoru s miješalom na BKHKO na 30°C, 50 o min⁻¹ i protoku zraka od 1 L min⁻¹.

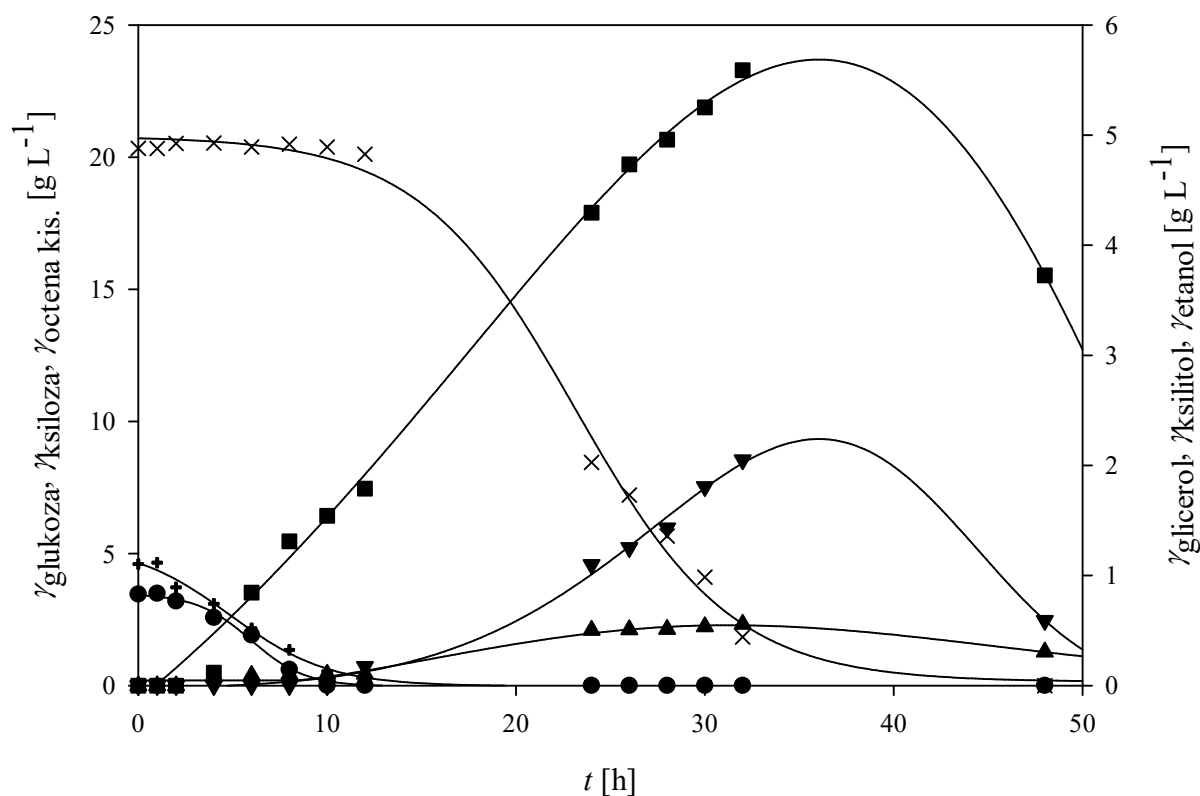
4.3.1.2. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na E-PKO u bioreaktoru s miješalom



Slika 38. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (×); glicerola (▲); ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom aerobnog uzgoja plijesni *M. indicus* u bioreaktoru s miješalom na E-PKO na 30°C, 50 o min⁻¹ i protoku zraka od 1 L min⁻¹.

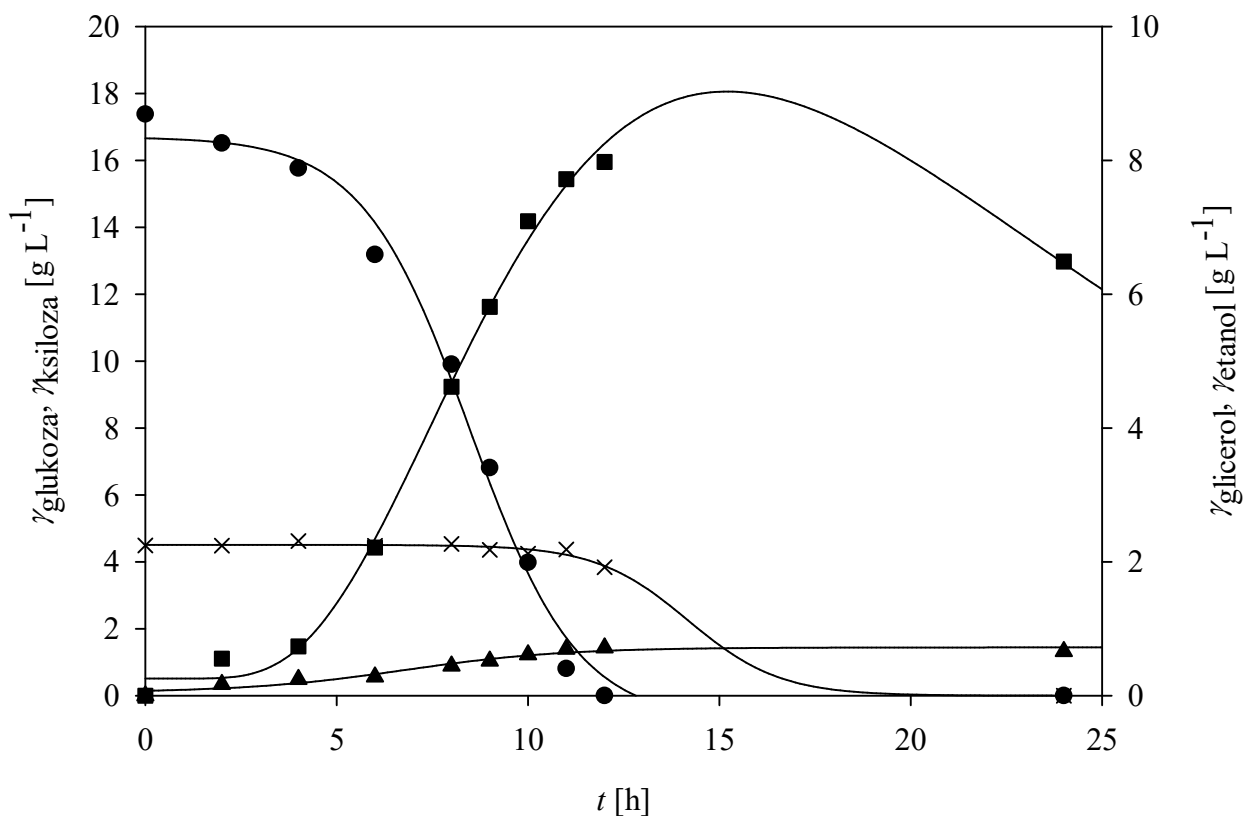
4.3.2. Rezultati uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u barbotirajućoj koloni

4.3.2.1. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na BKHKO u barbotirajućoj koloni



Slika 39. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (×); octene kiseline (+); glicerola (▲); ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom aerobnog uzgoja plijesni *M. indicus* u barbotirajućoj koloni na BKHKO na 30°C i protoku zraka od 2 L min⁻¹.

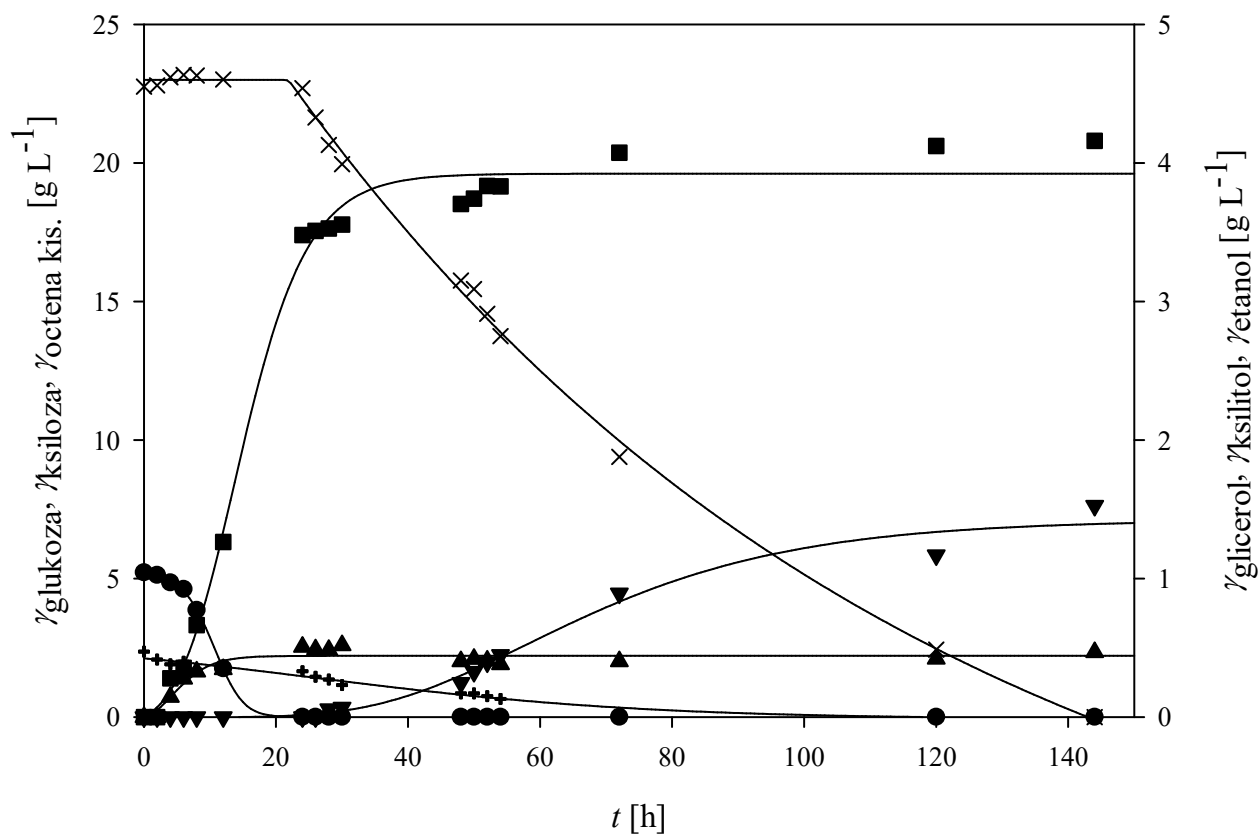
4.3.2.2. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na E-PKO u barbotirajućoj koloni



Slika 40. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (×); glicerola (▲); ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom aerobnog uzgoja plijesni *M. indicus* u barbotirajućoj koloni na E-PKO na 30°C i protoku zraka od 2 L min⁻¹.

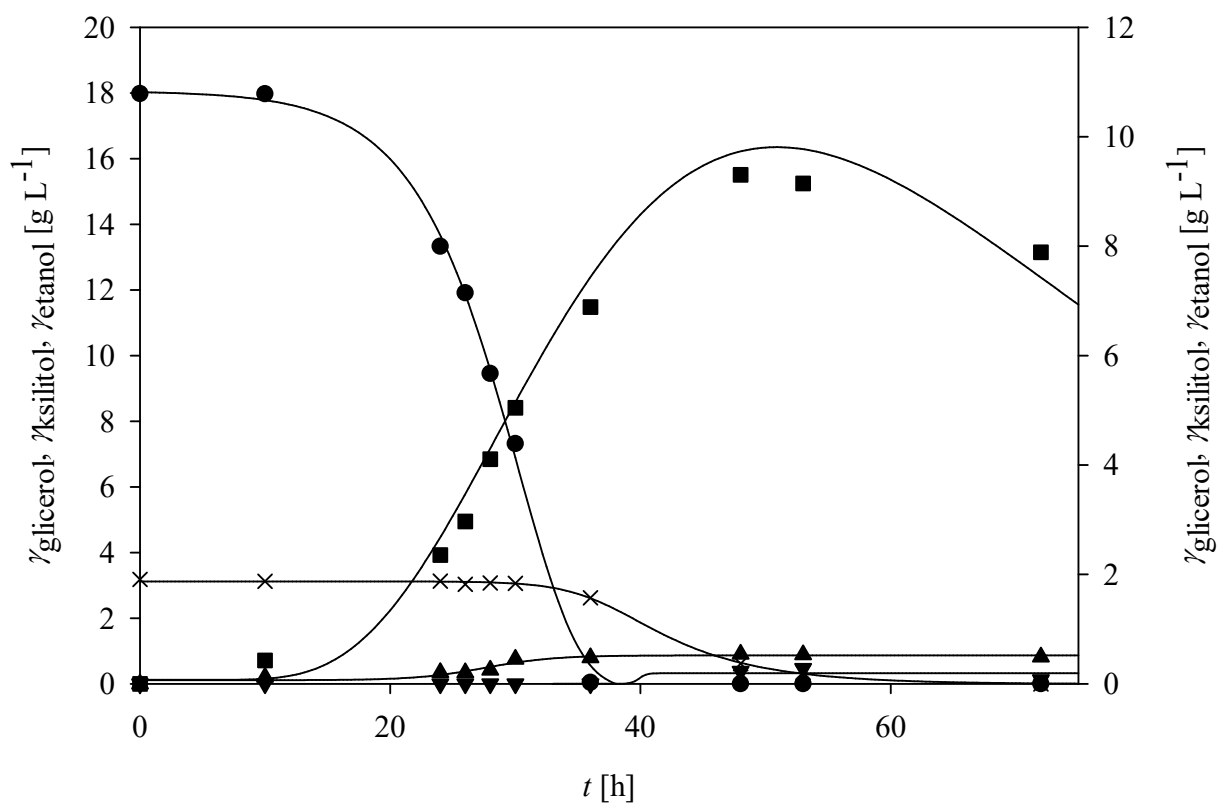
4.3.3. Rezultati uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u horizontalnom rotirajućem cijevnom bioreктору (HRCB)

4.3.3.1. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na BKHKO u HRCB-u



Slika 41. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (×); octene kiseline (+); glicerola (▲); ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom mikroaerofilnog uzgoja plijesni *M. indicus* u HRCB-u na BKHKO na sobnoj temperaturi i frekvenciji rotacije od 20 o min⁻¹.

4.3.3.2. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 u HRCB-u na E-PKO



Slika 42. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (×); glicerola (▲); ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom mikroaerofilnog uzgoja plijesni *M. indicus* u HRCB-u na E-PKO na sobnoj temperaturi i frekvenciji rotacije od 20 o min⁻¹.

4.3.4. Usporedba kinetičkih i pokazatelja uspješnosti bioprocesa u različitim bioreaktorima tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185

Tablica 25. Trajanje lag faze rasta i kinetički parametri rasta plijesni *M. indicus* na dvije različite hranjive podloge u različitim bioreaktorskim

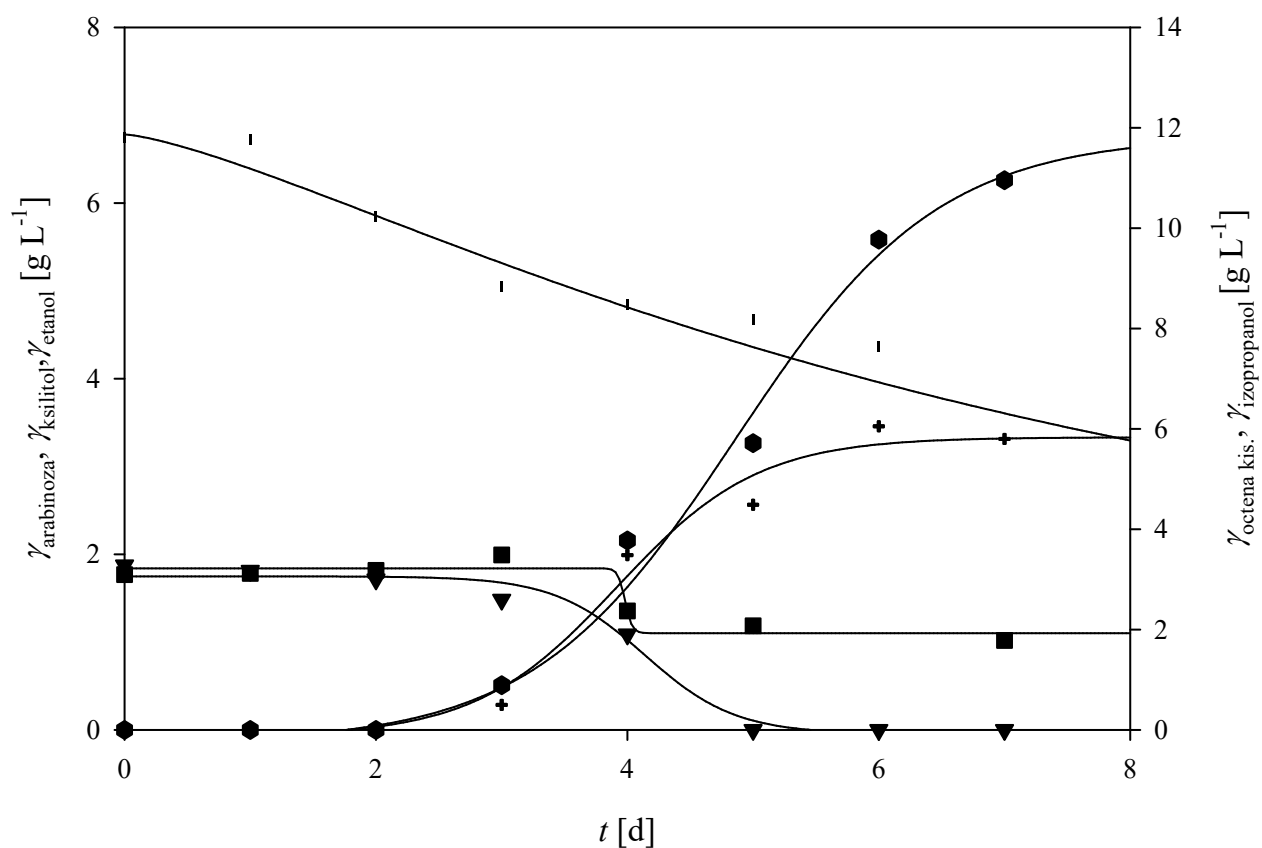
Reaktorski sustav	t_{lag} (h)	r_{glc} (h ⁻¹)	r_{xy1} (h ⁻¹)	r_{ac} (h ⁻¹)	r_{glc} (h ⁻¹)	r_{xoh} (h ⁻¹)	r_{etoh} (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{glc/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{xoh/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{xoh/s \max}$ (g g ⁻¹)	$Y_{etoh/s}$ (g g ⁻¹)	$Y_{etoh/s \max}$ (g g ⁻¹)
BKHKO													
Bioreaktor s miješalom	6	0,245	0,113	0,127	0,304	0,475	0,269	0,161	0,014	0,374	0,374	0,255	0,255
Barbotirajuća kolona	4	0,260	0,085	0,290	0,074	0,128	0,060	0,210	0,030	0,029	0,111	0,157	0,255
HRCB	10	0,167	0,024	0,019	0,054	0,065	0,220	0,204	0,017	0,088	0,088	0,149	0,149
E-PKO													
Bioreaktor s miješalom	1	0,249	0,105	0,000	0,124	0,269	0,528	0,294	0,012	0,000	0,205	0,280	0,393
Barbotirajuća kolona	4	0,489	0,017	0,000	0,135	0,000	0,288	0,369	0,288	0,000	0,000	0,300	0,442
HRCB	20	0,101	0,093	0,000	0,039	0,050	0,124	0,364	0,027	0,023	0,099	0,373	0,453

sustavima pri optimalnim uvjetima.

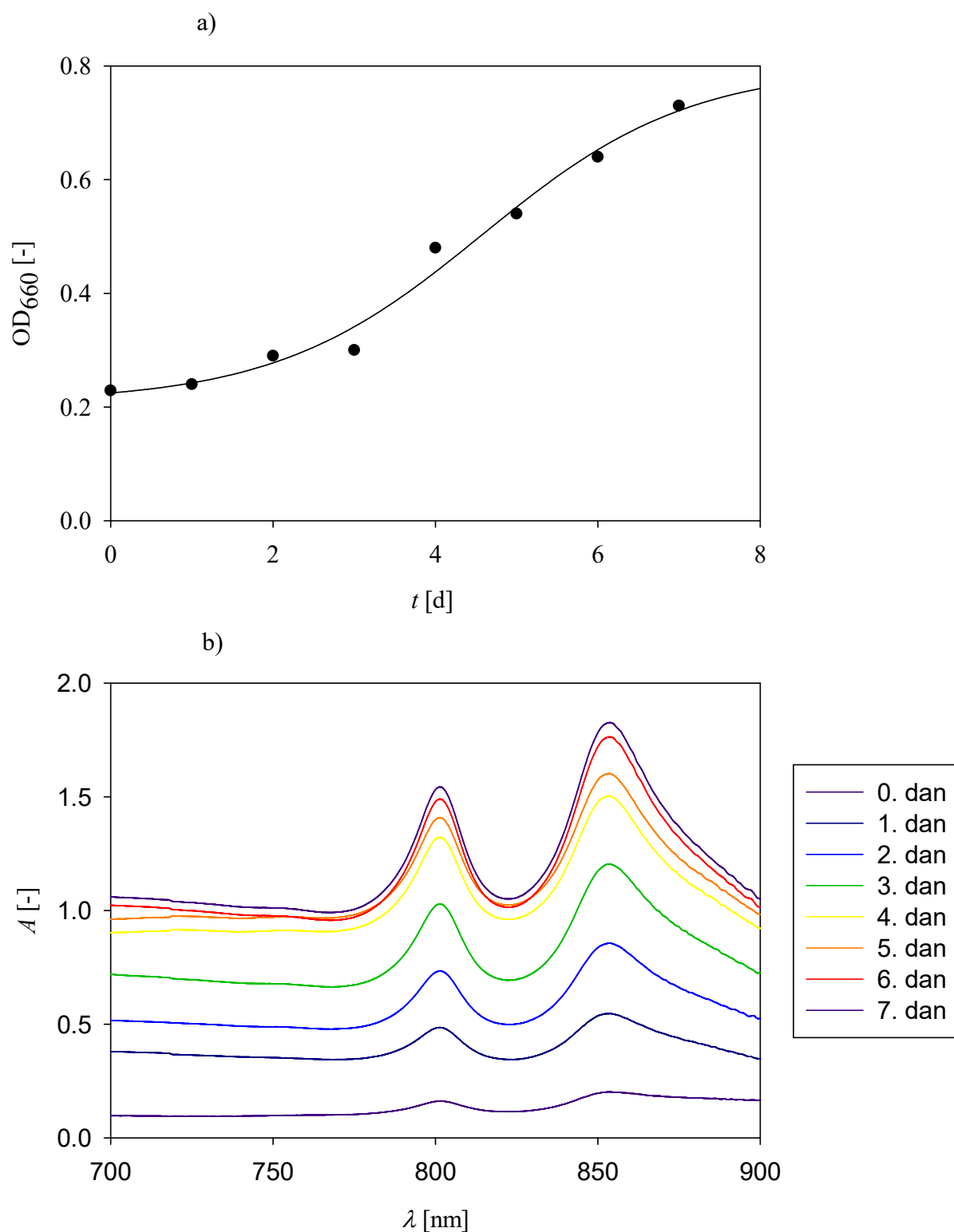
Reaktorski sustav	P_{rglc} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	$P_{rglcmax}$ (g L ⁻¹ h ⁻¹)	P_{rxoh} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	$P_{rxohmax}$ (g L ⁻¹ h ⁻¹)	P_{retoh} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	$P_{retohmax}$ (g L ⁻¹ h ⁻¹)
BKHKO						
Bioreaktor s miješalom	0,008	0,008	0,168	0,168	0,143	0,143
Barbotirajuća kolona	0,015	0,015	0,008	0,064	0,052	0,175
HRCB	0,003	0,003	0,013	0,013	0,029	0,029
E-PKO						
Bioreaktor s miješalom	0,006	0,014	0,000	0,027	0,222	0,363
Barbotirajuća kolona	0,028	0,060	0,000	0,000	0,270	0,665
HRCB	0,007	0,011	0,001	0,005	0,110	0,194

Tablica 26. Trajanje lag faze rasta i kinetički parametri rasta plijesni *M. indicus* na dvije različite hranjive podloge u različitim bioreaktorskim sustavima pri optimalnim uvjetima (nastavak).

4.3.5. Rezultati uzgoja bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 na TOHP dobivene nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom u mikroaerofilnim uvjetima uz izvor svjetla

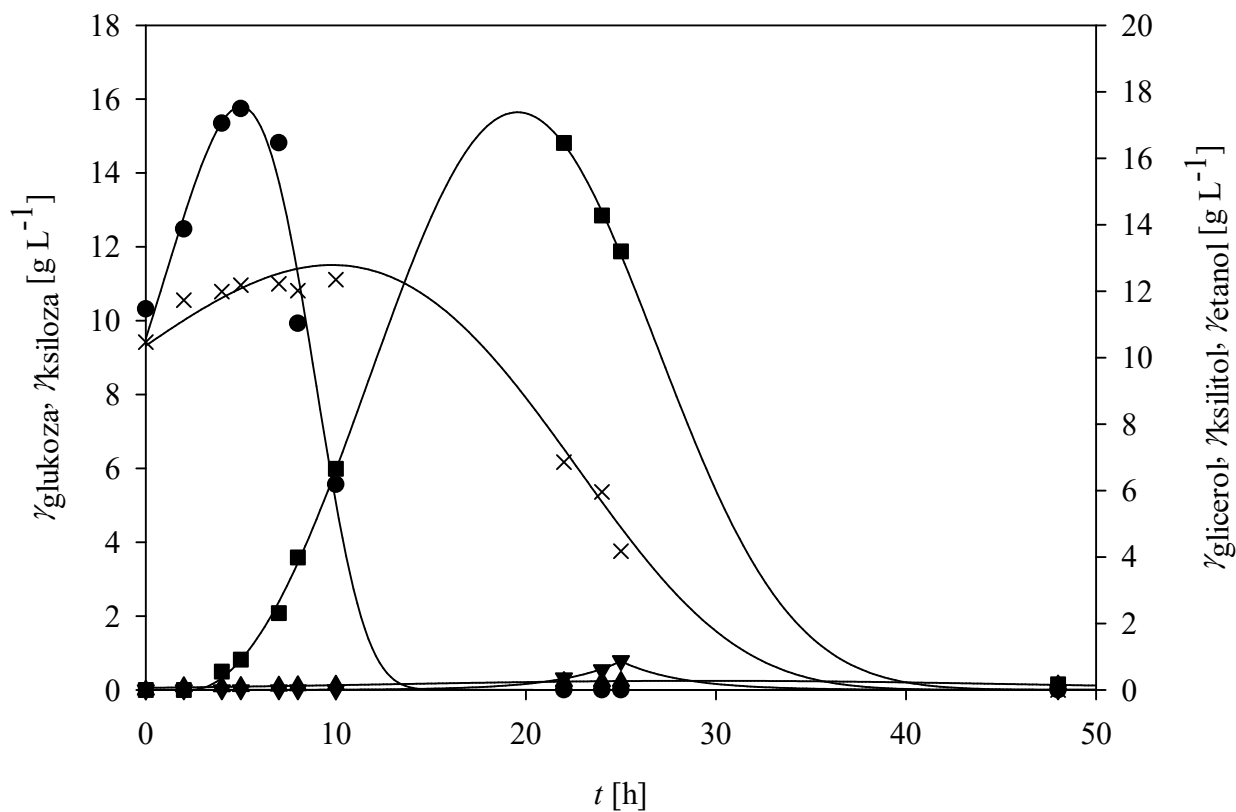


Slika 44. Promjena koncentracije arabinoze (|), octene kiseline (+); ksilitola (▼); etanola (■) i izopropanola (●) prilikom uzgoja bakterije *R. adriaticum* na TOHP dobivene nakon uzgoja plijesni *M. indicus*, u bioreaktoru s miješalom u mikroaerofilnim fototrofnim uvjetima na 30°C i 50 o min⁻¹.



Slika 45. Promjena: a) optičke gustoće; b) apsorbancije pigmenata; tijekom uzgoja bakterije *R. adriaticum* na TOHP dobivene nakon uzgoja plijesni *M. indicus*, u bioreaktoru s miješalom u mikroaerofilnim fototrofnim uvjetima na 30°C i 50 o min⁻¹.

4.3.6. Rezultati uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 tijekom simultane saharifikacije i fermentacije u bioreaktoru s miješalom



Slika 43. Promjena koncentracije glukoze (●); ksiloze (×); glicerola (▲); ksilitola (▼) i etanola (■) tijekom simultane saharifikacije i fermentacije plijesni *M. indicus* uz dodatak 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blenda i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozima L u bioreaktoru s miješalom na PKO pri 30°C, 50 o min⁻¹ i protoku zraka od 2 L min⁻¹.

4.4. Rezultati izdvajanja i pročišćavanja biokemikalija dobivenih tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u različitim bioreaktorskim sustavima na podlogama dobivenim fizikalno-kemijskim i biološkim procesima obrade lignoceluloznih sirovina

U ovom poglavlju prikazani su rezultati istraživanja izdvajanja i pročišćavanja biokemikalija (Poglavlje 3.2.6.).

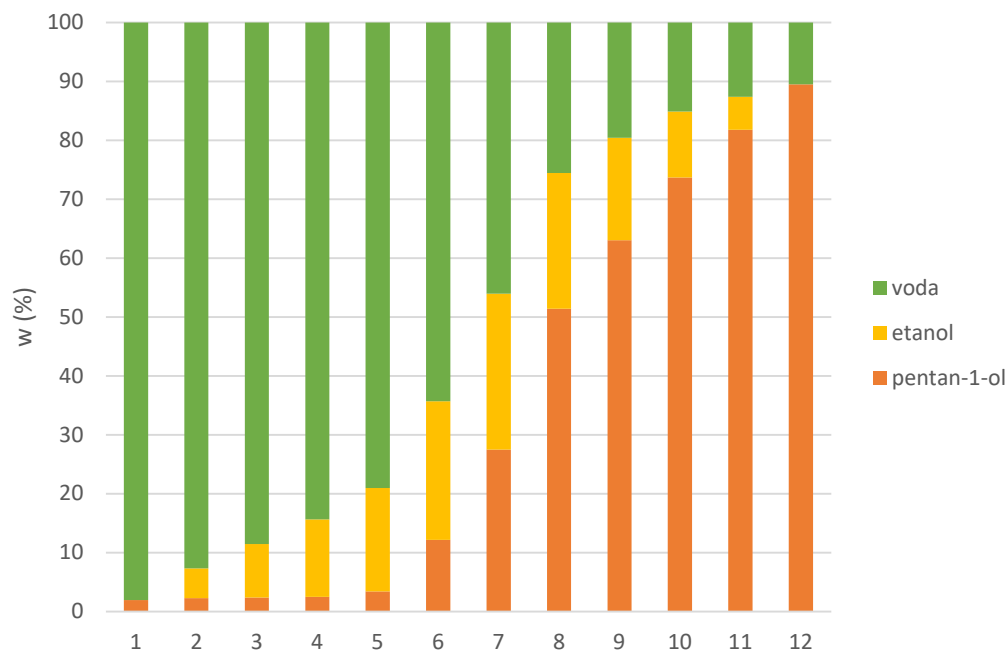
Podpoglavlje 4.4.1. sadrži rezultate eksperimenata ekstrakcije etanola višim alkoholima. U potpoglavlju 4.4.2. vidljivi su rezultati izdvajanja ksilitola, a potpoglavlje 4.4.3. sadrži rezultate izdvajanja hitina i hitozana iz biomase plijesni *M. indicus*.

4.4.1. Ekstrakcija etanola višim alkoholima

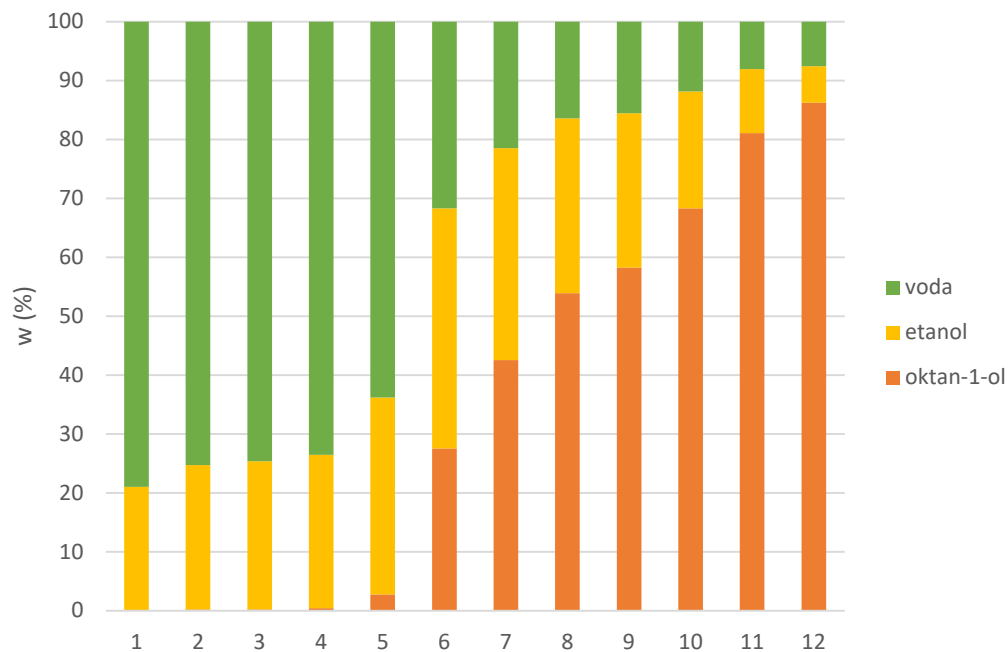
4.4.1.1. Izbor pogodnog organskog otapala za izdvajanje etanola

4.4.1.1.1. Preliminarno istraživanje ponašanja trokomponentnih smjesa i izrada trokutnih trokomponentnih dijagrama

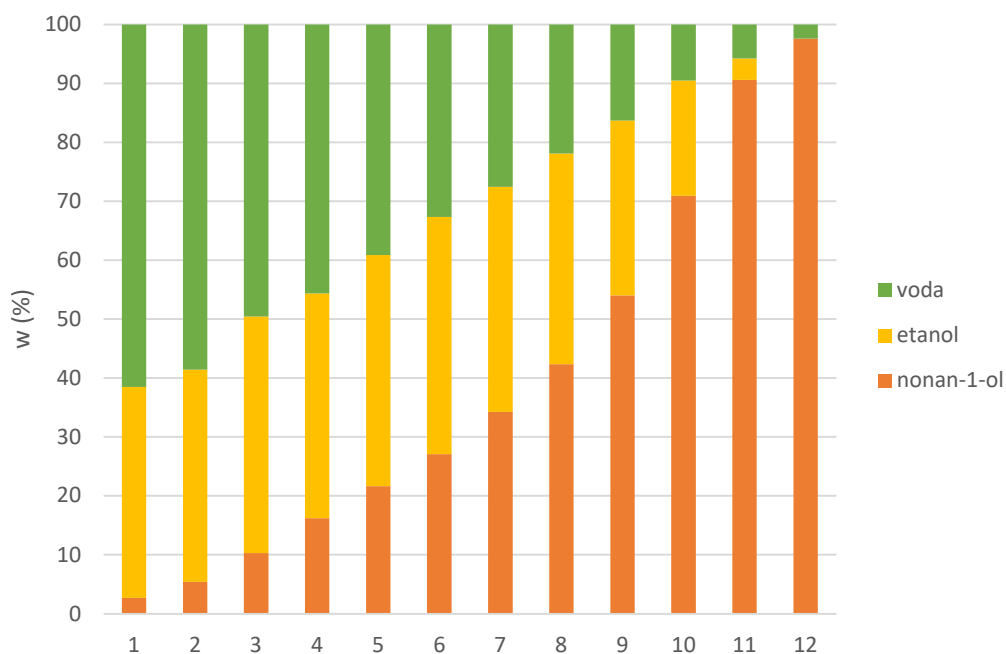
Istraživanjem ponašanja trojnih sustava organsko otapalo/etanol/voda dobivene su homogene smjese nastale miješanjem različitih količina otapalo/etanol/voda, a dobiveni podaci korišteni su za izradu trokomponentnih trokutnih dijagrama (Slika 46-49.).



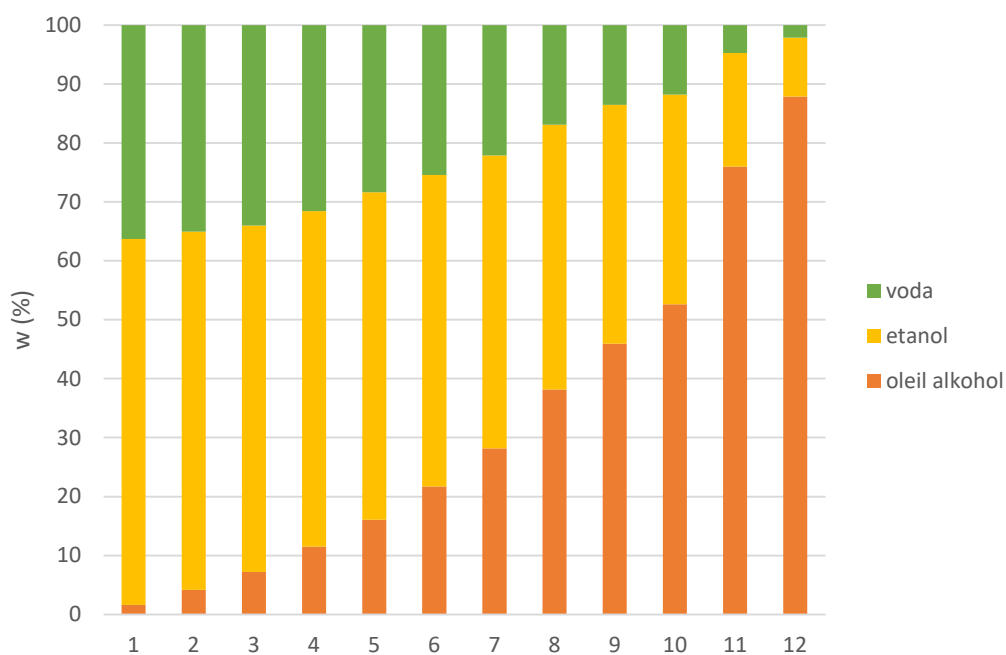
Slika 46. Prikaz koncentracijskih odnosa u trokomponentnoj smjesi (pentan-1-ol + etanol + voda) koji daju homogenu smjesu.



Slika 47. Prikaz koncentracijskih odnosa u trokomponentnoj smjesi (oktan-1-ol + etanol + voda) koji daju homogenu smjesu.



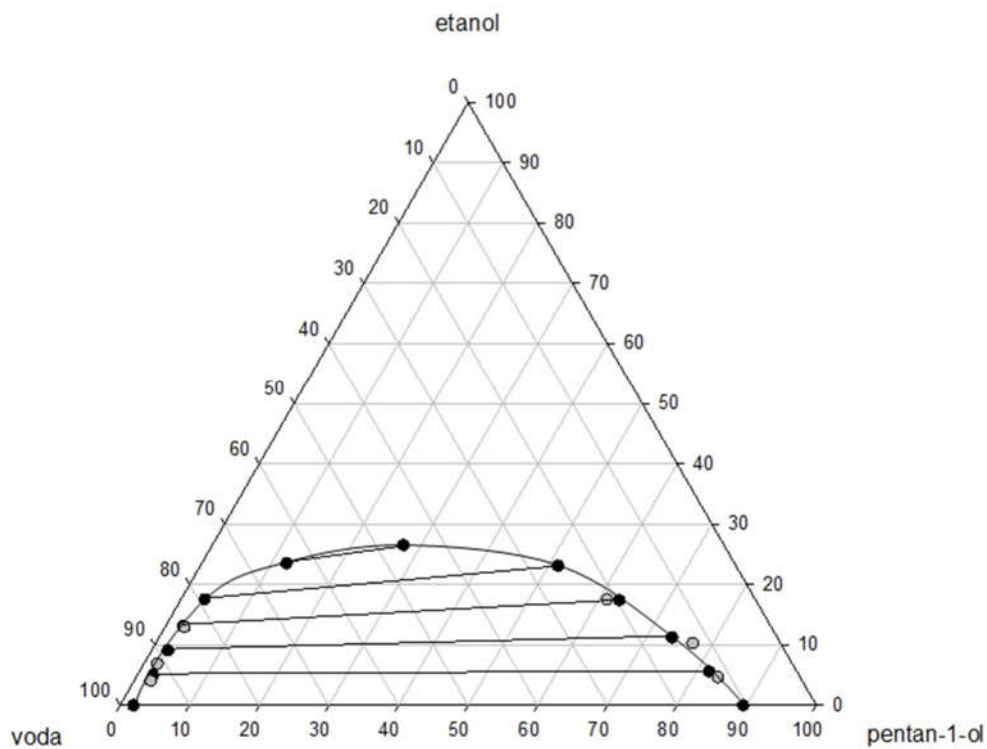
Slika 48. Prikaz koncentracijskih odnosa u trokomponentnoj smjesi (nonan-1-ol + etanol + voda) koji daju homogenu smjesu.



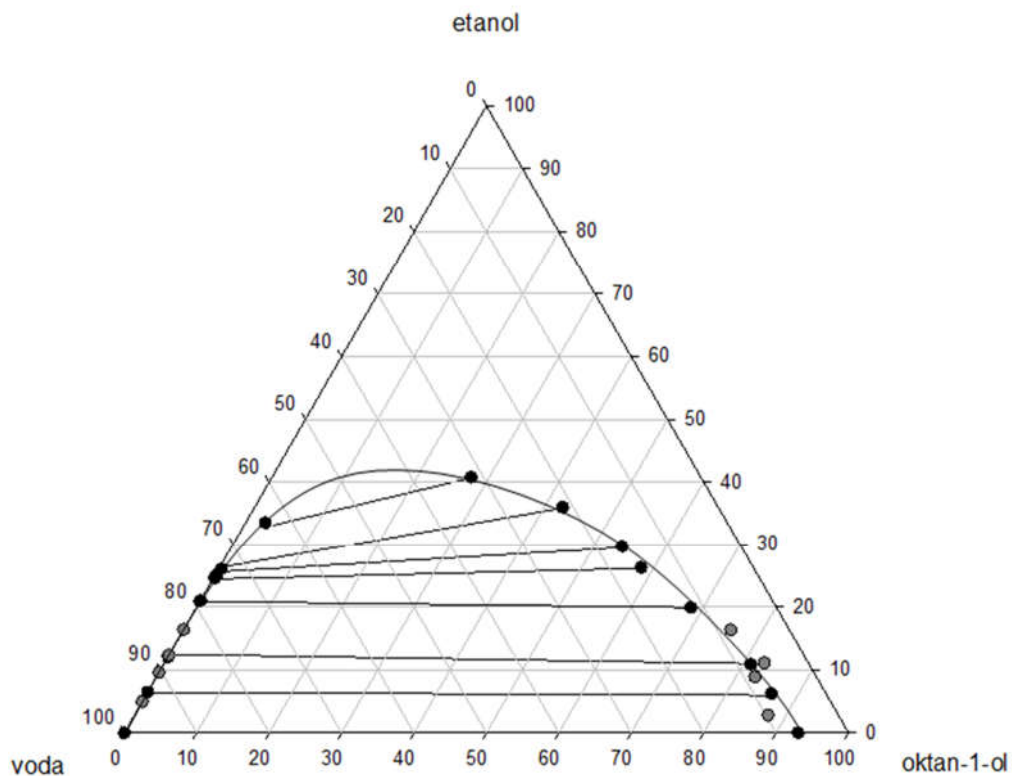
Slika 49. Prikaz koncentracijskih odnosa u trokomponentnoj smjesi (oleil alkohol + etanol + voda) koji daju homogenom smjesom.

4.4.1.1.2. Ravnotežne koncentracije, razdjeljivanje faza i izrada binodalnih krivulja za trokomponentne smjese

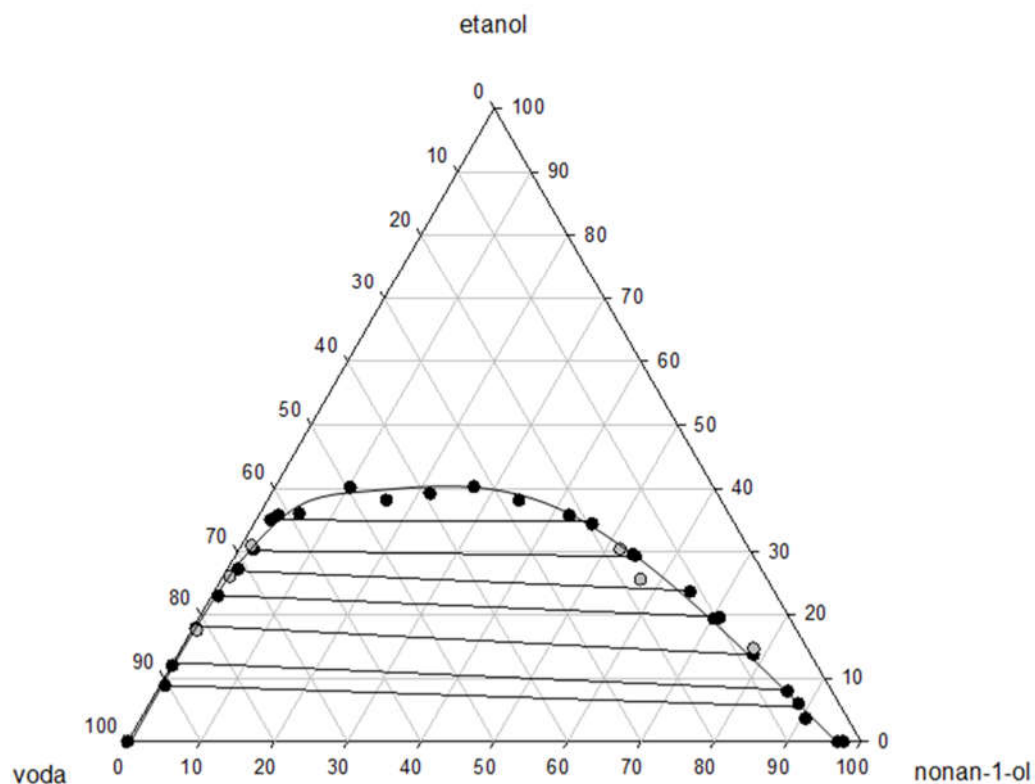
Višekratnim miješanjem i mirovanjem dobivene su razdvojene ravnotežne faze (organska i vodena) nastale iz smjese pojedinog otapala (pentan-1-ola, oktan-1-ola, nonan-1-ola i oleil alkohola). Iz vodene faze (rafinata) i organske faze (ekstrakt) uzeti su uzorci koji su analizirani plinskom kromatografijom. Dobiveni rezultati su preračunati u masene udjele etanola kao ključne sastavnice i masene udjele vode i organskog otapala u pojedinim fazama (rafinat i ekstrakt) koji su korišteni za izradu ravnotežne binodalne linije u trokutnim trokomponentnim dijagramima (Slika 50-53.). Ujedno su izračunati i koeficijenti raspodjele i faktor separacije, rezultati su prikazani u Tablici 27.



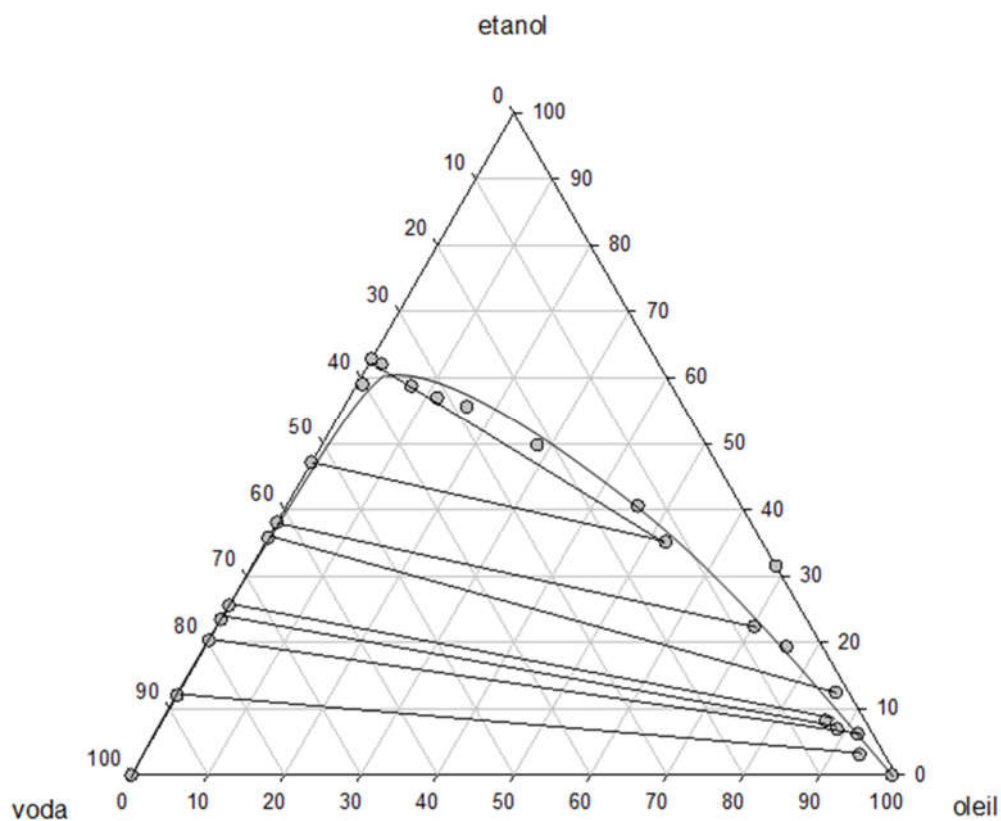
Slika 50. Binodalni trokomponentni dijagram za smjesu pentan-1-ol/etanol/voda. Legenda: (°) dobiveno eksperimentalno, (•) preuzeto iz rada Rahman i sur. (2001).



Slika 51. Binodalni trokomponentni dijagram za smjesu oktan-1-ol/etanol/voda. Legenda: (°) dobiveno eksperimentalno, (•) preuzeto iz rada Arce i sur. (1994).



Slika 52. Binodalni trokomponentni dijagram za smjesu nonan-1-ol/etanol/voda. Legenda: (◐) dobiveno eksperimentalno, (•) preuzeto iz rada Kirbaslar i sur. (2000).



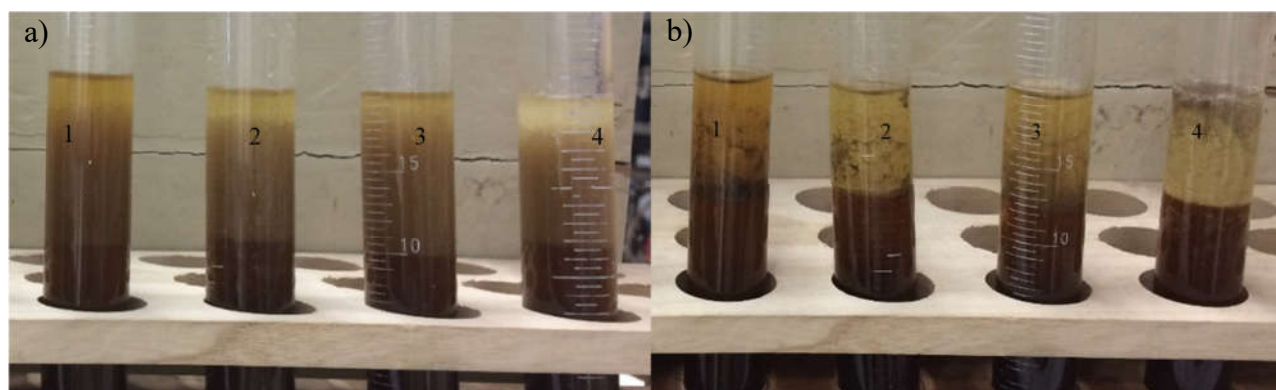
Slika 53. Binodalni trokomponentni dijagram za smjesu oleil alkohol/etanol/voda. Legenda: (◐) dobiveno eksperimentalno.

Tablica 27. Koeficijenti raspodjele za etanol K_{DE} i vodu K_{DW} te faktor separacije α .

Otapalo	Sastav organske faze		Sastav vodene faze		K_{DE}	K_{DW}	α
	W_{etanol} (% vol vol ⁻¹)	W_{voda} (% vol vol ⁻¹)	W_{etanol} (% vol vol ⁻¹)	W_{voda} (% vol vol ⁻¹)			
pentan-1-ol	5,00	9,60	4,40	93,60	1,14	0,10	11,08
	10,80	11,20	9,00	88,60	1,20	0,13	9,49
	20,00	15,00	16,00	81,00	1,25	0,19	6,75
	26,7,0	22,20	74,4	74,4	1,28	0,30	4,30
	29,80	32,60	70,00	70,00	1,29	0,47	2,77
nonan-1-ol	30,48	17,63	31,00	67,60	0,98	0,26	3,77
	14,63	7,34	17,52	81,84	0,83	0,09	9,31
	25,57	17,30	26,01	73,06	0,98	0,24	4,15
oktan-1-ol	0,00	100,00	0,00	6,96	0,96	0,08	11,89
	6,46	93,54	6,19	7,54	0,90	0,09	9,79
	12,08	87,92	10,86	8,07	0,95	0,15	6,32
oleil alkohol	22,36	7,40	38,05	61,95	0,59	0,12	4,92
	0,89	0,87	4,30	95,70	0,21	0,01	22,77
	0,65	0,76	3,27	96,73	0,20	0,01	25,30
	0,42	0,66	2,18	97,82	0,19	0,01	28,55

4.4.1.2. Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze u prisutnosti komponenata fermentirane hranjive podloge

Na Slici 54. prikazano. je razdvajanje organske i vodene faze uz prisutnost hidrolizata lignoceluloznog kompleksa (tretiranog s H_2SO_4), radnog mikroorganizma i etanola u smjesi.



Slika 54. Razdvajanje organske i vodene faze uz: a) prisutnost radnog mikroorganizma i hidrolizata lignoceluloznog kompleksa; b) uz prisutnost radnog mikroorganizma, hidrolizata lignoceluloznog kompleksa i etanola nakon 4 sata. Upotrebljeni ekstraktanti: (1) pentan-1-ol; (2) nonan-1-ol; (3) oktan-1-ol; (4) oleil alkohol.

4.4.1.3. Istraživanje ekstraktivnih svojstava ekstraktanata u kontinuiranom sustavu za ekstrakciju

Reynoldsovi brojevi miješala u sekciji za miješanje (Re_i) i Reynoldsovi brojevi za strujanje u sekciji za razdjeljivanje (Re) prikazani su u Tablici 28. Nakon ekstrakcije etanola u sustavu opisanom u Poglavlju 3.1.4.10. dobivene su frakcije koje su analizirane plinskom kromatografijom (Poglavlje 3.2.6.4.). Tablica 29. prikazuje rezultate analize organske i vodene faze.

Tablica 28. Granični Reynoldsovi brojevi miješala za sustav podloga/organsko otapalo kod kojih dolazi do dobrog miješanja ekstraktanata s podlogom.

Otapalo	N (o min^{-1})	Re_i	Re	Primjedba
pentan-1-ol	156	4514,04	2,16	Postoje dva sloja (sloj otapala i sloj vode)
	180	5208,51	2,16	Postoji sloj otapala, vode i emulzije
	200	5787,23	2,16	Potpuno dispergirano u vodi
oktan-1-ol	150	3973,07	1,98	Postoje dva sloja (sloj otapala i sloj vode)
	175	4635,25	1,98	Postoji sloj otapala, vode i emulzije
	187	4953,09	1,98	Potpuno dispergirano u vodi
nonan-1-ol	150	3759,20	1,87	Postoje dva sloja (sloj otapala i sloj vode)
	218	5463,37	1,87	Postoji sloj otapala, vode i emulzije
	230	5764,10	1,87	Potpuno dispergirano u vodi
oleil alkohol	180	4116,09	1,71	Postoje dva sloja (sloj otapala i sloj vode)
	193	4413,36	1,71	Postoji sloj otapala, vode i emulzije
	206	4710,64	1,71	Potpuno dispergirano u vodi

Tablica 29. Sastav rafinata i ekstrakta dobivenih u uređaju za istraživanje ekstrakcije.

Otapalo	$\phi_{\text{etanol}} (\% \text{ vol vol}^{-1})$	
	ekstrakt	rafinat
pentan-1-ol	5,91	7,57
oktan-1-ol	4,71	4,80
nonan-1-ol	4,08	6,53
oleil alkohol	0,34	7,00

4.4.1.4. Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije etanola

4.4.1.4.1. Izračun broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije za šaržnu ekstrakciju

Tablica 30. prikazuje izračun potrebne količine otapala i broja teoretskih stupnjeva za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju etanola istraživanim otapalima.

Tablica 30. Izračun potrebne količine otapala i broja teoretskih stupnjeva za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju primjenom binodalnih dijagrama za pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohol.

Otapalo	I. stupanj		II. stupanj		III. stupanj		...	VIII. stupanj		$\sum m_B$ (kg)	$\sum m_{EtOH/E}$ (kg)	U (%)
	$m_{EtOH/E1}$ (kg)	$m_{EtOH/R1}$ (kg)	$m_{EtOH/E2}$ (kg)	$m_{EtOH/R2}$ (kg)	$m_{EtOH/E3}$ (kg)	$m_{EtOH/R3}$ (kg)		$m_{EtOH/E8}$ (kg)	$m_{EtOH/R8}$ (kg)			
pentan-1-ol	15,91	47,23	9,52	37,74	17,75	19,97		-	-	300	47,47	75,21
nonan-1-ol	4,32	58,80	1,05	57,70	2,81	54,89		2,02	43,60	800	19,45**	30,81
oleil alkohol	0,97	62,17	0,99	61,20	-	-		-	-	200	1,96	3,11
oktan-1-ol	nije određeno (nije moguće dobiti ekstrakt sa višom koncentracijom etanola nego što je u mješavini)											

* početna masa podloge za sva otapala iznosila je 1000 kg, a masa etanola 63,12 kg. Za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju u svakom stupnju korišteno je 100 kg čistog otapala.

**za ekstrahiranje etanola do zadanog $R_n(>4\% \text{ m m}^{-1})$ potrebno je osam stupnjeva ekstrakcije.

*4.4.1.4.2. Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije
za kontinuiranu ekstrakciju*

Grafički je određen broj potrebnih stupnjeva ekstrakcije za kontinuiranu ekstrakciju te potreban protok za jednostupanjsku ekstrakciju s pojedinim otapalima (Prilog 9-10). Rezultati grafičkog određivanja minimalnog protoka ekstraktanta u protustrujnoj kontinuiranoj ekstrakciji $(F_{m,B})_{\min}$ i dobiveni udjeli etanola u ekstraktu i rafinatu prikazani su u Tablici 31.

Tablica 31. Rezultati grafičkog određivanja količine ekstraktanta.

Otapalo	Minimalni protok otapala	I. stupanj		II. stupanj	
	$(F_{m,B})_{\min}$ (kg/h)	$U_{EtOH/E1}$ (% tež/tež)	$U_{EtOH/R1}$ (% tež/tež)	$U_{EtOH/E2}$ (% tež/tež)	$U_{EtOH/R2}$ (% tež/tež)
pentan-1-ol	450	5,1	4,3	1,0	0,7
pentan-1-ol	528	4,2	4,0	-	-
oktan-1-ol	824	3,0	3,5	-	-
nonan-1-ol	1000	2,2	4,0	-	-
oleil alkohol	2655	0,9	4,3	0,2	1,7
oleil alkohol	3400	0,8	4,0	-	-

4.4.2. Izdvajanje ksilitola

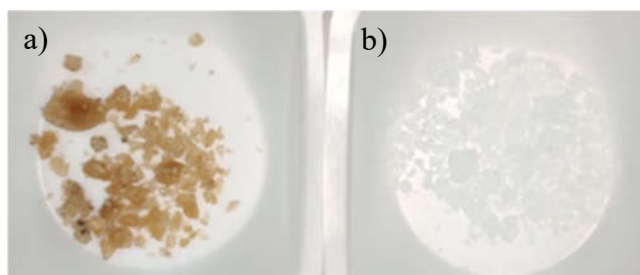
U ovom poglavlju su prikazani rezultati izdvajanja ksilitola (Poglavlje 3.2.6.6.). Dobiveni rezultati procesa izdvajanja ksilitola kristalizacijom uz dodatak antiotapala prikazani su u Tablici 32., a izgled kristala ksilitola izoliranih iz dvaju modelnih otopina prikazani su na Slici 55.

Tablica 32. Iskorištenje procesa izdvajanja ksilitola iz modelnih otopina.

Modelna otopina (MO)	Omjer otapalo / modelna otopina				
	aceton _{100%} : MO = 1:1	etanol _{$\varphi=60\%$} : MO = 1:1	etanol _{$\varphi=99,8\%$} : MO = 1:1	isopropanol _{100%} : MO = 1:1	isopropanol _{100%} : MO = 1:4
	Iskorištenje procesa (%)				
(1)	30,95	9,89	14,92	0	10,99
(2)	9,95	9,97	17,87	0	11,74

(1) Vodena otopina ksilitola

(2) Otopina ksilitola u BKHKO



Slika 55.. Kristali ksilitola izolirani iz: a) BKHKO; i b) otopine ksilitola u vodi.

4.4.3. Izdvajanje hitina i hitozana iz biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185

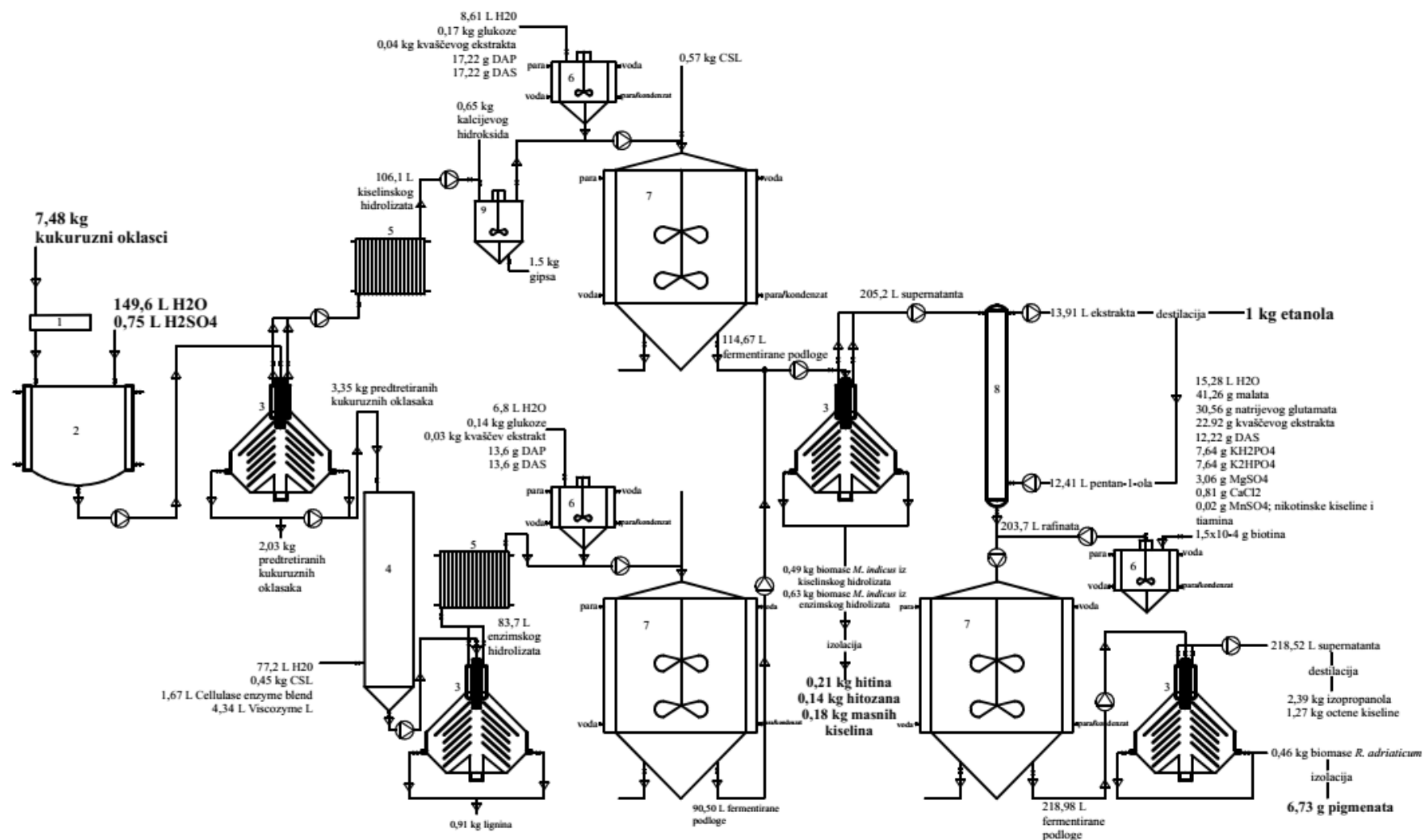
Izdvajanje hitina i hitozana iz biomase plijesni *M. indicus* provedena je kao što je prethodno opisano u Poglavlju 3.2.6.7.. Prinosi procesa izolacije hitina i hitozana nakon procesa uzgoja plijesni *Mucor indicus* provedenih u različitim bioreaktorima prikazani su u Tablici 33.

Tablica 33. Prinos hitina i hitozana iz biomase plijesni *M. indicus* dobivene nakon uzgoja u različitim bioreaktorima.

BKHKO	X (g L⁻¹)	Hitin (g g⁻¹)	Hitozan (g g⁻¹)
Bioreaktor s miješalom	4,34	0,21	0,13
Barbotirajuća kolona	5,00	0,30	0,16
HRCB	5,71	0,14	0,08
E-PKO			
Bioreaktor s miješalom	7,00	0,18	0,09
Barbotirajuća kolona	7,99	0,22	0,12
HRCB	7,67	0,15	0,07

4.5. Balance mase i proizvoda u integriranom biorafinerijskom sustavu proizvodnje biokemikalija i biogoriva iz lignocelulozne sirovine

U ovom poglavlju prikazana je procesna shema integriranoga biorafinerijskoga sustava proizvodnje biokemikalija i biogoriva iz kukuruznih oklasaka. Slika 56. ujedno sadrži i materijalne bilance sirovina i proizvoda ovog sustava. Za izračunavanje bilanci korišteni su podaci dobiveni u ovom radu.



Slika 56. Materijalna bilanca i bilanca sirovina i proizvoda integriranoga biorafinerijskoga procesa proizvodnje biokemikalija i biogoriva. Procesna shema sadrži: 1-mlin za mljevenje lignocelulozne sirovine; 2-visokotlačni reaktor za predobradu sirovine; 3-centrifugalni separator; 4-reaktor za enzimsku hidrolizu; 5-izmjenjivač topline; 6-propagator; 7-bioreaktor s miješalom; 8-kolona za ekstrakciju tekuće-tekuće, 9-posuda za neutralizaciju podloge.

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

5.1. Fizikalno-kemijska i biološka obrada te priprema otpadnih lignoceluloznih sirovina za proizvodnju specifičnih biokemikalija i biogoriva primjenjujući biorafinerijski pristup

U ovoj dijelu istraživanja, provedena je predobrada različitih lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru korištenjem razrijeđene sumporne kiseline prema postupku opisanom u Poglavlju 3.2.1. Određeni su sastavi tekuće i krute faze dobivene nakon predobrade, ujedno je provedena i enzimska hidroliza odabrane predobrađene lignocelulozne sirovine komercijalnim enzimskim pripravcima.

5.1.1. Fizikalno kemijska predobrada otpadnih lignoceluloznih sirovina u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature

Cilj ovih eksperimenata bio je odrediti uvjete za predobradu različitih lignoceluloznih sirovina pri kojima se ostvaruje najveći prinos fermentabilnih šećera (glukoza, ksiloza, arabinoza) i najmanji prinos nusprodukata (octena i mravlja kiselina, furani i lignin topljiv u kiselini) koji inhibiraju proces fermentacije. S obzirom na rezultate dobivene na temelju prethodnih istraživanja u sklopu projekta *"Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina"* (HRZZ 9158), u kojem je između ostalog izvršena usporedba uspješnosti procesa predobrade slame pri različitim temperaturama i vremenima zadržavanja pri korištenju različitih koncentracija sumporne i fosforne kiseline u visokotlačnom reaktoru (Marđetko i sur., 2018). U ovom radu su za ispitivanje utjecaja vremena zadržavanja na uspješnosti procesa predobrade pšenične slame odabrane temperature u intervalu od 160°C do 200°C. Za svaku temperaturu procesi su provedeni pri tri različita vremena zadržavanja: 1, 5 i 10 min. Učinkovitost hidrolize lignoceluloznih sirovina prikazana je kao saharifikacijski prinos (postotak hidrolizirane glukoze, ksiloze i arabinoze u usporedbi s njihovim početnim sadržajem u sirovini) ili kao koncentracija novonastalog šećera (glukoze, ksiloze i arabinoze) te kiselina (octene, mravlje i levulinske kiseline) u g L⁻¹ (Marđetko i sur., 2018).

5.1.1.1. Fizikalno-kemijska predobrada pšenične slame u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature

Pšenična slama ima veliki potencijal za primjenu u proizvodnji biokemikalija. Naime, prema Državnom zavodu za statistiku 2017. godine u Hrvatskoj je proizvedeno oko 1 130 000 tona slame koja ostaje neiskorištena, a mogla bi se iskoristiti kao sirovina u različitim bioprocima (DZS 2018). Sastav pšenične slame korištene u ovom radu prikazan je u Tablici 1. u poglavlju 3.2.1.. Pšenična slama prema literaturnim podacima sadržava: 35-45% celuloze, 20-30% hemiceluloze i 15% lignina (Saha i sur., 2005), dok je prema radu autora Khan i Mubeen, sastav pšenične slame nešto drugačiji te se sastoji od 33,7% do 40% glukana u suhoj tvari, te od 21 do 26% ksilana i arabinana izraženih kao hemiceluloza (Khan i Mubeen, 2012). Naime, sastav pšenične slame varira ovisno o sorti, klimatskom pojasu njenog uzgoja te o analitičkim metodama korištenim za određivanje njenog sastava, te su to i mogući razlozi određenog odstupanja sastava analizirane slame od literaturnih podataka.

Rezultati eksperimenata kiselinske predobrade slame u visokotlačnom reaktoru pri 160°C, 180°C i 200°C i vremenima zadržavanja od 1, 5, i 10 min prikazani su na Slikama 9-11.

Slika 9. prikazuje rezultate oštećenja, tj maseni udio (w) glukana, ksilana i arabinana iz početne sirovine prisutan u tekućoj fazi dobivenoj nakon hidrolize slabom kiselinom. Iz rezultata sastava tekuće faze nakon kiselinske predobrade pšenične slame vidljivo je kako je udio ksilana veći od udjela glukana i arabinana za sve primijenjene uvjete predobrade. To je u skladu s literaturom gdje se navodi kako tijekom predobrade razrijeđenom kiselinom većinom dolazi do razgradnje hemicelulozne frakcije lignocelulozne sirovine budući da se ona lakše hidrolizira od celuloze (Lenihan i sur., 2010). Tekuća faza dobivena nakon predobrade pri 180°C i vremenu zadržavanja od 10 min sadrži maksimalan udio ksilana i to 64,86% ksilana iz početne sirovine što odgovara koncentraciji od 12,56 g L⁻¹. Slično se može primjetiti i za udio arabinana, gdje pri istim primijenjenim uvjetima tekuća faza sadržavala 45,84% arabinana iz početne sirovine ($\gamma_{\text{arab}}=2,11$ g L⁻¹). Maksimalne vrijednosti udjela ukupnih arabinana i ksilana postignute su upravo pri temperaturi od 180°C i vremenu zadržavanja od 10 min, dok daljnjim povećanjem temperature dolazi do pada udjela ksilana i arabinana u tekućoj fazi, te su tako pri 200°C postignuti minimalni udjeli ksilana i arabinana od 20,89% ($\gamma_{\text{ksi}}=4,35$ g L⁻¹) i 20,25% ($\gamma_{\text{arab}}=1,14$ g L⁻¹). Djioleu i Carrie (2016) navode kako koncentracija ksiloze opada ne samo s porastom temperature, već i s povećanjem vremena zadržavanja (s 10 na 20 min) pri čemu

dolazi do smanjenja njene koncentracije s 13,9 g L⁻¹ na gotovo 0 g L⁻¹, te je to pripisano degradaciji ksiloze u hidroksimetilfurfural. Suprotan trend primijećen je s udjelom glukana u tekućoj fazi koji s porastom temperature poprima veće vrijednosti. Tako je minimalan udio glukana od 2,64% ($\gamma_{\text{glc}}=1,15 \text{ g L}^{-1}$) dobiven pri 160°C i vremenu zadržavanja od 1 min, dok je pri 200°C i vremenu zadržavanja od 10 min postignut maksimalan udio glukana, te iznosi 18,96% ($\gamma_{\text{glc}}=9,53 \text{ g L}^{-1}$). Ova pojava je u skladu s literaturom gdje je zabilježeno kako više temperature tijekom blago kiseline hidrolize pogoduju hidrolizi celuloze (Saha i sur., 2005; Sun i Cheng, 2005). Slične rezultate dobili su i Djioleu i Carrie (2016) koji ujedno navode kako je predobradom na 180°C došlo do porasta koncentracije glukoze s 1,5 na 11,2 g L⁻¹ povećanjem vremena zadržavanja s 10 na 30 min.

Iz rezultata prikazanim na Slici 10. također je vidljivo kako s porastom temperature dolazi i do porasta koncentracije potencijalnih inhibitora bioprocesa. Octena kiselina nastaje hidrolizom acetilnih grupa hemiceluloze, te je vidljivo iz rezultata da njena koncentracija raste povišenjem temperature i vremena zadržavanja, te je najniža koncentracija zabilježena pri 160°C i vremenu zadržavanja od 1 min, te iznosi 0,43 g L⁻¹, a maksimalna koncentracija od 1,20 g L⁻¹ zabilježena je pri 200°C i 10 min. Zamijećeni trendovi u promjeni koncentracije ksiloze i inhibitora u skladu su s literaturom gdje se navodi kako je temperatura ključni faktor koji utječe na degradaciju šećera u inhibitore, te više primjenjene temperature rezultiraju većim koncentracijama inhibitora (Chandel i sur., 2012). Degradacijom iz pentoza nastaje furfural, a iz heksoza hidroksimetilfurfural (HMF) (Satimanont i sur., 2012; Lenihan i sur., 2010). Koncentracija ovih spojeva varira ovisno o korištenim uvjetima prilikom predobrade (van der Pol i sur., 2016; Boguta i sur., 2014; Harmsen i sur., 2013), te mogu utjecati na efikasnost bioprocesa u većoj ili manjoj mjeri (Satimanont i sur., 2012). Najveće koncentracije furana (HMF i furfural) su za sve temperature predobrade dobivene uz vrijeme zadržavanja od 10 min, a najveća koncentracija furana detektirana je u hidrolizatu dobivenom nakon predobrade pri 180°C i vremenu zadržavanja od 10 min, te je iznosila 1001,6 mg L⁻¹. Najmanja koncentracija furana zabilježena je pri 160°C i vremenu zadržavanja od 1 min, i to 61,7 mg L⁻¹. Na Slici 10. vidljivo je i povećanje koncentracije furana s povećanjem vremena zadržavanja za navedene temperature predobrade, no ipak pri 200°C ove koncentracije su manje, od 705,53 do 929,48 mg L⁻¹, od one maksimalno postignute. Literatura navodi kako u ekstremnim uvjetima kao što su visoka temperatura, ali i duže vrijeme zadržavanja dolazi do razgradnje HMF-a i furfurala u levulinsku i mravlju kiselinu (Jönsson i Martín, 2016; Djioleu i Carrier, 2016). To je i moguće objašnjenje primijećenog trenda promjene koncentracije ukupnih furana budući da je s

povećanjem vremena zadržavanja došlo do povećanja koncentracije mravlje kiseline za sve primjenjene temperature predobrade. Najveća koncentracija mravlje kiseline zabilježena je pri vremenu zadržavanja od 10 min i iznosila je 0,68 g L⁻¹ za temperaturu od 160°C, 1,20 g L⁻¹ za temperaturu od 180°C i za 200°C iznosila je 1,49 g L⁻¹. Iz ovoga je također vidljivo kako se koncentracija mravlje kiseline povećava s povećanjem temperature. Osim toga, na najvišoj temperaturi predobrade od 200 °C detektirana je i levulinska kiselina koja nije detektirana pri nižim temperaturama. Ovu pojavu objašnjava literatura kroz činjenicu da ova kiselina nastaje u ekstremnim uvjetima (visoka temperatura ili dugo vrijeme zadržavanja) razgradnjom HMF-a (Jönsson i Martín, 2016). Njena koncentracija je kod vremena zadržavanja od 1 min i 5 min iznosila 0,04 g L⁻¹ odnosno 0,06 g L⁻¹, a maksimalna koncentracija je postignuta na vremenu zadržavanja od 10 min i iznosila je 0,08 g L⁻¹. Udio lignina topivog u kiselini raste s porastom temperature, te je pri 200 °C iznosio maksimalnih 3,28%.

Iako primjena viših temperatura rezultira manjom koncentracijom furana, viša temperatura dovodi i do manje ukupne količine šećera u hidrolizatu. Najveća ukupna masa šećera (glukana, ksilana i arabinana) je postignuta prilikom predobrade na 180 °C uz vrijeme zadržavanja od 10 min i iznosila je 110,36 g ($\gamma_{uk\ uglijik}=17,86\text{ g L}^{-1}$). Daljnje povećanje temperature na 200 °C daje masu šećera od 77,10 g ($\gamma_{uk\ uglijik}=13,43\text{ g L}^{-1}$) koja je postignuta kod vremena zadržavanja od 10 minute. Stoga je potrebno pronaći uvjete u kojima će se postići adekvatan omjer šećera i inhibitora kako bi proizvodnja etanola bila što uspješnija, uz što manju inhibiciju radnog mikroorganizma.

Nakon dvostupanjske kiselinske hidrolize krutih ostataka dobivenih predobradom pšenične slame u visokotlačnom reaktoru pomoću razrijeđene sumporne kiseline utvrđen je njihov sastav. Rezultati su prikazani na Slici 11. Najveći udio u ukupnoj masi predobrađene pšenične slame na svim primjenjenim uvjetima predobrade otpada na glukani. To je u skladu s literaturom prema kojoj se kiselinskom predobradom uglavnom degradira hemiceluloza (Chandel i sur., 2012; Zhang i sur., 2012; Lenihan i sur., 2010). Povećanjem temperature i vremena zadržavanja predobrade raste količina glukana u tekućoj fazi, pa se samim time udio glukana u predobrađenoj pšeničnoj slami smanjuje s povećanjem vremena zadržavanja. Najveći udio glukana u predobrađenoj slami od ukupno prisutnih u početnoj sirovini postignut je pri uvjetima od 160°C te je u rasponu od 91,94% do 94,48%, što upućuje na to kako se celuloza tj. glukani nisu razgradili tijekom predobrade. U ovim uvjetima u predobrađenoj krutoj fazi se nalazi i 46,52% do 60,75% od ukupnih ksilana i 39,31% do 70,41% od ukupnih arabinana, što ukazuje na slabu razgradnju hemiceluloze. Povećanjem temperature i vremena

zadržavanja dolazi do smanjenja udjela glukana, ksilana i arabinana, te su minimalne vrijednosti zabilježene pri 200°C i vremenu zadržavanja od 10 min i iznose 76,34% od ukupnih glukana, 26,68% od ukupnih ksilana i 9,73% od ukupnih arabinana, što se podudara s rezultatima sastava tekuće faze gdje povećanjem temperature i vremena zadržavanja dolazi do povećanja udjela glukana, ksilana i arabinana, ali i produkata njihove razgradnje tj. inhibitora. Također se može primijetiti i prividno povećanje udjela lignina netopljivog u kiselini s povećanjem temperature i vremena zadržavanja, te se s početnih 16,12% (originalna sirovina) povećao do maksimalnih 31,69%. Budući da u pšeničnoj slami predobrađenoj kiselinom zaostaju znatne količine glukana, takva predobrađena sirovina mogla bi se podvrgnuti enzimskoj hidrolizi čime bi se maksimalno iskoristila dostupna sirovina. Sastavi kiselinom predobrađene pšenične slame su u skladu s literaturom u kojoj se navodi kako se razgradnjom hemiceluloze kiselinskom predobradom degradira lignocelulozna struktura što rezultira povećanom dostupnošću celuloze enzimima i posljedično tome povećanom razgrađivošću sirovine (Chandel i sur., 2012; Zhang i sur., 2012).

5.1.1.2. Fizikalno-kemijska predobrada otpadne trave u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature

Sastav početne sirovine određen je dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom otpadne trave i analizom dobivenog hidrolizata pomoću visokoučinkovite tekućinske kromatografije. Obradom rezultata dobiven je sastav početne sirovine Tablica 1. (Poglavlje 3.1.2.). Otpadna trava prema literaturnim podacima sadržava: 25-40% celuloze, 25-50% hemiceluloze i 10-30% lignina (Saini i sur., 2007.). U svom istraživanju Y. Chen i suradnici (2007) izvještavaju o nešto drugačijem sastavu otpadne trave te ona u suhoj tvari sadržava od 28 do 38% glukana, te 11-19% ksilana i 1,5-3% arabinana izraženih kao hemiceluloza. Naime kao što je već napomenuto i za sastav slame, sastav otpadne trave ovisi o više različitih faktora te su zbog toga moguća odstupanja u sastavu otpadne trave.

Iz rezultata sastava tekuće faze nakon kiselinske predobrade otpadne trave (Slika 12.) vidljiv je sličan trend u sastavu, kao i kod sastava hidrolizata slame. Naime vidljivo je kako je uspješnost oštećenja ksilana i arabinana iz početne sirovine veća od udjela glukana za sve primjenjene uvjete predobrade, što je opet u skladu s literaturom, gdje se navodi da tijekom predobrade razrijeđenom kiselinom većinom dolazi do razgradnje hemicelulozne frakcije (Zhang i sur., 2012; Lenihan i sur., 2010). Maksimalan udio ksilana iz početne sirovine u tekućem dijelu dobiven je pri temperaturi od 180°C, te se kreće u rasponu od 81,53% do

93,93%, što odgovara koncentraciji ksilana od 13,16 g L⁻¹ do 14,04 g L⁻¹, dok je namanji udio dobiven pri 160°C, od 30,22% do 53,13%, što ukazuje na neučinkovitu hidrolizu hemiceluloze pri ovoj temperaturi. Daljnjim povećanjem temperature na 200°C smanjuje se udio ksilana u tekućem dijelu, te se kreće u rasponu od 54,77% do 83,89% (koncentracija od 10,66 g L⁻¹ do 14,04 g L⁻¹), dok udio arabinana postiže svoju maksimalnu vrijednost od 100% pri ovoj temperaturi i vremenu zadržavanja od 10 min ($\gamma_{\text{arab}}=2,7$ g L⁻¹). Najmanji udio glukana zabilježen je pri najnižoj temperaturi od 160°C (6,06%), dok daljnim povećanjem temperature i vremena zadržavanja dolazi do postepenog povećanja udjela glukana (Slika 12) te dostiže maksimalne vrijednosti pri temperaturi od 200°C u rasponu od 9,81% do 15,85% od ukupnih glukana iz početne sirovine (koncentracije 4,29 do 7,71 g L⁻¹), što je u skladu s literaturom gdje je zabilježeno kako više temperature tijekom kiselinske hidrolize pogoduju hidrolizi celuloze (Saha i sur., 2005; Sun i Cheng, 2002). Kao i kod predobrade slame, primjena viših temperatura rezultira manjom koncentracijom ukupne količine šećera u hidrolizatu, i većom koncentracijom inhibitora. Najveća ukupna masa šećera (glukana, ksilana i arabinana) postignuta je pri temperaturi od 180°C uz vrijeme zadržavanja od 10 min i iznosila je 147,2 g ($\gamma_{\text{uk ugljik}}=24,69$ g L⁻¹), dok je minimalna ukupna masa od 63,3 g ($\gamma_{\text{uk ugljik}}=9,28$ g L⁻¹) zabilježena pri najnižoj temperaturi i vremenu zadržavanja od 1 min. Slični rezultati dobiveni su i u drugim istraživanjima hidrolize otpadne trave s razrijeđenim kiselinama (Świątek i sur., 2020; Redding i sur., 2011; Neureiter i sur., 2004).

Slika 13. prikazuje promjenu koncentracije inhibitora u ovisnosti o temperaturi i vremenu zadržavanja. Vidljivo je iz rezultata da se koncentracija inhibitora povećava povećanjem temperature i vremena zadržavanja. Tako je maksimalna koncentracija octene kiseline detektirana pri 200°C i vremenu zadržavanja od 1 min te iznosi 4,26 g L⁻¹, dok su minimalne koncentracije zabilježene pri 160°C, od 0,45 g L⁻¹ do 0,75 g L⁻¹. Pri temperaturi od 180°C, koncentracije octene kiseline se kreću u rasponu od 1,03 do 1,28 g L⁻¹. Koncentraciju furana prati isti očekivani porast s primjenom više temperature hidrolize te se kreće u rasponu od 28,95 mg L⁻¹, pri najnižoj temperaturi, do 1234,21 mg L⁻¹ pri najvišoj temperaturi. Pri 200°C ujedno je detektirana i levulinska kiselina i to u koncentracijama od 0,04 g L⁻¹, 0,06 g L⁻¹ i 0,12 g L⁻¹ pri vremenima zadržavanja od 1 min, 5 min i 10 min. Povišenjem temperature dolazi i do povećanja koncentracije mravlje kiseline, tako su pri 160°C koncentracije u rasponu od 0,94 g L⁻¹ do 1,51 g L⁻¹, pri 180°C od 1,19 g L⁻¹ do 1,44 g L⁻¹, te pri 200°C koncentracije su između 1,85 g L⁻¹ i 3,72 g L⁻¹. Udio lignina topivog u kiselini također raste s porastom temperature, tako je minimalan udio zabilježen pri 160°C i iznosio je 0,70%, te je narastao do

maksimalnih 0,95% pri najvišoj temperaturi. Ovi rezultati utjecaja temperature i vremena zadržavanja na koncentracije inhibitora se donekle podudaraju i s onima prikazanim u prethodnom poglavlju, ali i s literaturom (Świątek i sur., 2020; Djioleu i Carrier, 2016; Redding i sur., 2011)

Analizom sastava krutih faza predobrađene otpadne trave dobiveni su rezultati prikazani na Slici 14. Za razliku od koncentracije glukoze u tekućem kiselinskom hidrolizatu, udio glukana od ukupno prisutnih u početnoj sirovini tj. u krutom hidrolizatu je znatno veći i kreće se od 42,81% do 83,72%. Udio ksilana u krutom hidrolizatu je manji od onog u tekućem i kreće se između 5,93% pri najvećoj temperaturi i vremenu zadržavanja od 10 min, do 25,78% pri najnižoj temperaturi. Udjeli arabinana detektirani u krutoj fazi hidrolizata otpadne trave su jako mali i iznose između 0,03% pri 200°C i 3,92% pri 160°C. To je u skladu s literaturom gdje se navodi da pri predobradi otpadne trave s razrijeđenom sumpornom kiselinom dolazi do opuštanja arabinana iz hemiceluloze povećanjem temperature, što rezultira manjim udjelom arabinana u predobrađenoj krutoj fazi sirovine (Y. Chen i sur., 2007). Lignin netopiv u kiselini (LNTK) i pepeo određeni su u čvrstoj fazi hidrolizata otpadne trave te je određen njihov zajednički udio koji se kreće u rasponu od 26,21% do 34,54% (Slika 14.). Najveći udio LNTK u iznosu od 34,54% određen je pri temperaturi od 200°C i vremenu zadržavanja od 10 min.

5.1.1.3. Fizikalno-kemijska predobrada kukuruzovine u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature

Kukuruzovina (cijela stabljika bez klipa) je poljoprivredni nusproizvod koji se dobije nakon berbe kukuruza. Prosječan sastav zrele biljke u vrijeme berbe je 46% zrno i 54% kukuruzovina (Pordesimo i sur., 2005). Kukuruzovina je široko rasprostranjena i dostupna u velikim količinama uz relativno nisku prodajnu cijenu (Varga i sur., 2004). Sastav početne sirovine određen je kao i kod prethodnih sirovina, dvostupanjskom kiselinskom hidrolizom sirovine te je potom određen sastav koristeći visokoučinkovitu tekućinsku kromatografiju. Sastav kukuruzovine prikazan je u Tablici 1. u Poglavlju 3.1.2.. Prema literaturnim podacima sastav kukuruzovine se mijenja ovisno o zrelosti biljke, ali i o podneblju uzgoja te o različitim drugim faktorima koji su već ranije spomenuti (Mourtzinis i sur., 2016; Pordesimo i sur., 2005). Kukuruzovina sadrži 26-39% celuloze, 15-23% hemiceluloze i 11-20% lignina (Weiss i sur., 2010; Templeton i sur., 2009; Chen i sur., 2007).

Kiselinskom predobradom kukuruzovine pri različitim temperaturama i vremenima zadržavanja korištenjem 0,5% m vol⁻¹ sumpornom kiselinom dobiveni su tekući dijelovi čiji

sastavi su prikazani na Slici 15. Rezultati ošećerenja su slični rezultatima dobivenih i za prethodne dvije sirovine, pšeničnu slamu i otpadnu travu. Naime vidljivo je da tekući dio sadrži značajan dio ksilana i arabinana iz početne sirovine, dok je udio glukana znatno manji, što upućuje na to da je došlo do značajne razgradnje hemiceluloze (Zhang i sur., 2012; Lenihan i sur., 2010). Najveće vrijednosti ošećerenja ksilana i arabinana postignute su pri temperaturi od 180°C, te se kreću u rasponu od 51,94% do 92,32% ksilana i 52,67% do 71,72% arabinana. Maksimalno ošećerenje ksilana postignuto je pri 180°C i vremenu zadržavanja od 10 min, te iznosi 92,32%, što odgovara koncentraciji ksilana od 14,32 g L⁻¹. Pri ovim uvjetima predobrade postignut je i maksimalan udio arabinana iz početne sirovine u hidrolizatu od 71,17% ($\gamma_{\text{arab}}=2,30$ g L⁻¹). Povećanjem i snižavanjem temperature (na 160°C, odnosno 200°C) udio ksilana i arabinana iz početne sirovine prisutan u tekućem hidrolizatu kukuruzovine se smanjuje. Tako su pri 160°C postignute najmanje vrijednosti udjela ksilana od 34,07% do 51,93% ($\gamma_{\text{ksi}}=5,00$ g L⁻¹ do 8,06 g L⁻¹), dok su najmanji udjeli arabinana postignuti pri 200°C, od 39,73% do 41,98% ($\gamma_{\text{arab}}=1,40$ do 1,54 g L⁻¹). Slika 15. pokazuje kako se udio glukana povećava s povećanjem temperature i vremena zadržavanja. Pri 160°C udio glukana iz početne sirovine u hidrolizatu kreću se u rasponu od 3,56% do 4,74% (1,26 g L⁻¹ do 1,77 g L⁻¹) što ujedno predstavlja i minimalne vrijednosti udjela za sve temperature i vremena zadržavanja. Povećanjem temperature predobrade na 180°C, koncentracije glukana u hidrolizatu se povećavaju ovisno o vremenu zadržavanja na 3,71 g L⁻¹ do 6,23 g L⁻¹, odnosno na 9,68% do 16,69% glukana iz početne sirovine. Maksimalni udio glukana u hidrolizatu postignut je pri 200°C i vremenu zadržavanja od 10 min, 17,85%, što odgovara koncentraciji glukana od 7,27 g L⁻¹ i ukazuje na bolju hidrolizu celuloze pri višim temperaturama i vremenima zadržavanja (Saha i sur., 2005; Sun i Cheng, 2002). Primjena viših temperatura i vremena zadržavanja rezultira smanjenjem ukupne mase šećera prisutnih u tekućem hidrolizatu, kao i kod predobrade slame i otpadne trave. Minimalna ukupna masa šećera od 42,69 g ($\gamma_{\text{uk ugljik}}=6,73$ g L⁻¹) dobivena je pri temperaturi od 160°C i vremenu zadržavanja od 1 minute, dok je maksimalna ukupna masa od 121,67 g šećera ($\gamma_{\text{uk ugljik}}=20,28$ g L⁻¹) dobivena pri 180°C i vremenu zadržavanja 10 min. Daljnjim povećanjem temperature ukupna masa šećera se smanjuje, no povećava se masa glukana u tekućem hidrolizatu, te je tako maksimalna masa glukana od 35,99 g dobivena pri 200°C i 10 min. Istraživanja koja su se bavila predobradom kukuruzovine došla su do sličnih rezultata i zaključaka utjecaja temperature i vremena zadržavanja na sastav tekućeg hidrolizata kukuruzovine (Weiss i sur., 2010; M. Chen i sur., 2009; Lloyd i Wyman, 2005; Zhu i sur., 2005).

Promjena koncentracije inhibitora prisutnih u tekućem dijelu hidrolizata kukuruzovine prikazane su na Slici 16. Primjećuje se sličan trend u usporedbi s prethodnim sirovinama, naime rezultati pokazuju da koncentracije inhibitora rastu s povećanjem temperature i vremena zadržavanja. Maksimalna koncentracija octene kiseline detektirana je pri maksimalnoj temperaturi od 200°C i vremenu zadržavanja od 10 min, te iznosi 2,45 g L⁻¹. Snižavanjem temperature i vremena zadržavanja koncentracija octene kiseline pada, pa se pri 180°C kreće u rasponu od 1,43 g L⁻¹ do 1,89 g L⁻¹, a pri 160°C one su u rasponu od 0,74 g L⁻¹, što je ujedno i minimalna postignuta vrijednost koncentracije octene kiseline, do 0,99 g L⁻¹. Povećanjem temperature hidrolize dolazi i do očekivanog porasta koncentracije furana, te se kreće u rasponu od minimalne vrijednosti od 108,97 mg L⁻¹ pri najmanjoj temperaturi i vremenu zadržavanja, do maksimalnih 1549,68 mg L⁻¹ pri 200°C i vremenu zadržavanja 10 min. Pri najvećoj temperaturi je kod svih vremena zadržavanja detektirana i levulinska kiselina, u koncentracijama od 0,07 g L⁻¹ za 1 min i 0,09 g L⁻¹ za 5 min i 10 min, što sugerira da dolazi do daljnje razgradnje HMF-a i furfurala (Djioleu i Carrier, 2016; Jönsson i Martín, 2016). Uslijed razgradnje HMF-a i furfurala pri najvećoj temperaturi postignute su i maksimalne koncentracije mravlje kiseline, pri vremenu zadržavanja 1 min ona iznosi 1,00 g L⁻¹, pri 5 min koncentracija je 1,35 g L⁻¹, a pri 10 min je 1,69 g L⁻¹. Pri nižim temperaturama zabilježene su i manje koncentracije mravlje kiseline, tako se pri 180°C kreću u rasponu od 0,75 g L⁻¹ do 1,20 g L⁻¹, a pri najnižoj temperaturi od 160°C detektirane su koncentracije mravlje kiseline od 0,42 g L⁻¹ do 0,79 g L⁻¹. Udio lignina topljivog u kiselini raste s povećanjem temperature, te postiže maksimalnu vrijednost od 2,82% pri 200°C i vremenu zadržavanja 10 min, a minimalna vrijednost je zabilježena pri 160°C i 1 min te iznosi 2,11%. Usporedbom udjela lignina topljivog u kiselini za svaku temperaturu, može se primijetiti da on raste kako se povećava vrijeme zadržavanja, pri 160°C udjeli su 2,11%, 2,22% i 2,43%, pri 180°C oni su 2,49%, 2,52% i 2,75% te pri 200°C udjeli lignina topljivog u kiselini su 2,33%, 2,52% i 2,82, za vremena zadržavanja 1 min, 5 min i 10 min..

Nakon provedene dvostupanjske kiselinske hidrolize kukuruzovine dobiveni su rezultati sastava čvrstih faza kiselinski predobrađene kukuruzovine, te su prikazani na Slici 17. Kao i kod predorađene slame i otpadne trave, i kod predobrađene kukuruzovine je udio glukana iz izvorne sirovine znatno veći i kreće se u rasponu od 73,53% pri najvećoj temperaturi predobrade od 200°C i vremenu zadržavanja 10 min, do 98,04% pri temperaturi od 160°C, što ukazuje da se celuloza učinkovitije razgrađuje pri većim temperaturama. Udjeli ksilana i arabinana su manji od onih u tekućem dijelu hidrolizata, te se smanjuju s povećanjem

temperature i vremena zadržavanja. Udjeli ksilana iz početne sirovine u predobrađenoj kukuruzovini dobivenoj nakon predobrade pri 160°C iznose 45,14%, 44,25%, 39,09%; pri 180°C udjeli su 32,98% 16,22% 11,78%, a pri 200°C oni su 28,07%, 8,85%, 5,89% za vremena zadržavanja 1 min, 5 min i 10 min. Udjeli arabinana se kreću od minimalnih 19,06% pri najvišoj temperaturi do maksimalnih 34,58% pri najnižoj temperaturi. Ujedno se sa Slike 17. može vidjeti da dolazi do prividnog rasta udjela LNTK povećanjem temperature i vremena zadržavanja, te se s početnih 26% iz izvorne sirovine povećaju do maksimalnih 33,89% pri najvećoj temperaturi i vremenu zadržavanja 10 min. Sličan sastav krute faze dobiven je i u drugim istraživanjima predobrade kukuruzovine (Weiss i sur., 2010; M. Chen i sur., 2009; Lloyd i Wyman, 2005;).

5.1.1.4. Fizikalno-kemijska predobrada kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru slabom kiselinom pri uvjetima povišenog tlaka i temperature

Prinos kukuruznih oklasaka po hektaru iznosi oko 1,42-1,53 t_{suhe tvari}, te zajedno s kukuruzovinom čine velik dio biljke kukuruza. Procijenjeno je da se iz 100 kg kukuruza proizvede 18 kg kukuruznih oklasaka (Kapoor i sur., 2016; Zych, 2008.). Netretirani kukuruzni oklasci podvrgnuti su dvostupanjskoj kiselinskoj hidrolizi te je nakon toga analiziran njihov sastav, rezultati analize prikazani su u Tablici 1. (Poglavlje 3.2.1.). L. Wang i sur. (2011) u svom radu izvještavaju da se kukuruzni oklasci sastoje od 40-44% celuloze, 31-33% hemiceluloze te 16-18% lignina, dok rezultati Pointner i sur. (2014) govore o sastavu od 38,8% ± 2,5% celuloze, 44,4% ± 5,2% hemiceluloze i 11,9% ± 2,3% lignina. Kao i s prethodnim sirovinama, sastav kukuruznih oklasaka varira ovisno o klimatskom području uzgoja, vremenskim uvjetima tijekom rasta i drugim faktorima.

Nakon provedene predobrade pri različitim temperaturama i vremenima zadržavanja s 0,5% m vol⁻¹ sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru te analizom sastava, dobiveni su rezultati uspješnosti oštećenja početne sirovine koji su prikazani na Slici 18. Postoji sličnost s rezultatima dobivenih za prethodne sirovine. Uslijed primijenjenih uvjeta predobrade tekući dio kukuruznih oklasaka uglavnom sadrži ksilane i arabinane, dok je udio glukana manji, što opet upućuje na to da je došlo do signifikantne razgradnje hemiceluloze (Lenihan i sur., 2010; L. Zhang i sur., 2012). Udio ksilana iz početne sirovine se postepeno povećava povećanjem temperature i vremena zadržavanja te dostiže maksimum pri 180°C i vremenu zadržavanja 10 min, 94,24%; 23,60 g L⁻¹, daljnjim povećanjem temperature udio ksilana iz početne sirovine u tekućem hidrolizatu se smanjuje, pa tako pri 200°C, ovisno o vremenu

zadržavanja, varira između 52,29% ($\gamma_{ksi}=11,36 \text{ g L}^{-1}$) i 71,26% ($\gamma_{ksi}=16,98 \text{ g L}^{-1}$). Minimalan udio ksilana od 49,11%, što odgovara koncentraciji od $12,00 \text{ g L}^{-1}$, zabilježen je pri najmanjoj temperaturi i vremenu zadržavanja. Maksimalan udio arabinana postignut je pri temperaturi 180°C , te varira između 37,16% ($\gamma_{arab}=0,99 \text{ g L}^{-1}$) i 40,50% ($\gamma_{arab}=1,45 \text{ g L}^{-1}$). Smanjenjem ili povećanjem temperature u odnosu na 180°C , udjeli arabinana padaju, pa su pri 160°C između 36,53% i 42,62%, a kod 200°C između 33,72% i 36,53%. Udio glukana iz početne sirovine prati sličan trend kao i kod rezultata sastava tekućih dijelova dobivenih nakon predobrade prethodno navedenih sirovina. Povećanjem temperature i vremena zadržavanja udio glukana se povećava, te s minimalne vrijednosti od 2,76% ($\gamma_{glc}=0,88 \text{ g L}^{-1}$) pri 160°C i vremenu zadržavanja 1 min, povećava se na maksimalnu vrijednost od 31,49% ($\gamma_{glc}=8,99 \text{ g L}^{-1}$) pri 200°C i vremenu zadržavanja 10 min, što je u skladu s literaturom koja tvrdi da pri višim temperaturama dolazi do bolje razgradnje celuloze (Saha i sur., 2005; Sun i Cheng, 2002). Kao i kod prethodnih predobrada, primjena većih temperatura i dužih vremena zadržavanja rezultira smanjenjem ukupne mase šećere prisutne u tekućem hidrolizatu. Maksimalna masa ukupnih šećera od 148,02 g ($\gamma_{uk \text{ ugljik}}=25,09 \text{ g L}^{-1}$), koju većinom čini masa ksiloze (122,53 g), postignuta je pri 180°C i vremenu zadržavanja 10 min. Ovo je ujedno i maksimalna ukupna masa šećera dobivena nakon predobrade svih lignoceluloznih sirovina korištenih u ovom istraživanju. Daljnjim povećanjem temperature dolazi do smanjenja ukupne mase na 125,85 g ($\gamma_{uk \text{ ugljik}}=20,29 \text{ g L}^{-1}$), 125,43 g ($\gamma_{uk \text{ ugljik}}=20,23 \text{ g L}^{-1}$) i 75,95 g ($\gamma_{uk \text{ ugljik}}=11,17 \text{ g L}^{-1}$) pri vremenima zadržavanja 1 min, 5 min i 10 min. Minimalne razlike u masi ukupnih šećera prisutnih u tekućem hidrolizatu dobivene su pri najmanjoj temperaturi te se kreću u rasponu od 75,86 g do 77,86 g. Druga istraživanja predobrade kukuruznih oklasaka objavila su slične rezultate i zaključke (Kharina i sur., 2020; Pointner i sur., 2014; Satimanont i sur., 2012; Wang i sur., 2011).

Uslijed djelovanja visokih temperatura i dužih vremena zadržavanja dolazi do formiranja inhibitora, čije koncentracije su prikazane na Slici 19. Iz rezultata se vidi da koncentracija octene kiseline donekle prati udjele ksilana i arabinana s obzirom da nastaje hidrolizom acetilnih grupa hemiceluloze. Povećanjem temperature raste i koncentracija octene kiseline. Najmanje koncentracije zabilježene su pri temperaturi 160°C i iznose $0,95 \text{ g L}^{-1}$, $1,06 \text{ g L}^{-1}$ i $1,12 \text{ g L}^{-1}$ za vremena zadržavanja 1 min, 5 min i 10 min. Povećanjem temperature na 180°C povećava se i koncentracija octene kiseline u hidrolizatu na $1,57 \text{ g L}^{-1}$, $1,78 \text{ g L}^{-1}$ i $2,02 \text{ g L}^{-1}$, dok su maksimalne vrijednosti koncentracije octene kiseline $2,38 \text{ g L}^{-1}$, $3,25 \text{ g L}^{-1}$ i $4,69 \text{ g L}^{-1}$ postignute pri 200°C i vremenima zadržavanja 1 min, 5 min i 10 min. Koncentracija

furana također se povećava povećanjem temperature. Minimalna koncentracija od 210,54 mg L⁻¹ zabilježena je pri najmanjoj temperaturi i najkraćem vremenu zadržavanja. Daljnjim povećanjem temperature i vremena zadržavanja dolazi do povećanja koncentracije, te su pri 180°C detektirane koncentracije 303,49 mg L⁻¹, 670,45 mg L⁻¹ i 970,65 mg L⁻¹ pri odgovarajućim vremenima zadržavanja. Maksimalna koncentracija furana postignuta je pri najvećoj temperaturi od 200°C i najdužem vremenu zadržavanja od 10 min te iznosi 1684,48 mg L⁻¹, što je skoro dvostruko više od koncentracije dobivene pri istoj temperaturi i vremenu zadržavanja 5 min. Kao i kod prethodnih sirovina, i ovdje uslijed djelovanja visoke temperature od 200°C dolazi do daljnje razgradnje HMF-a do levulinske kiseline (Djioleu i Carrier, 2016; Jönsson i Martín, 2016). Koncentracije levulinske kiseline su kod ovih ekstremnih uvjeta iznosile 0,10 g L⁻¹, 0,26 g L⁻¹ i 0,40 g L⁻¹. Povećanjem temperature dolazi i do povećanjem koncentracije mravlje kiseline (Slika 19.), te je maksimalna koncentracija od 1,86 g L⁻¹ postignuta pri 200°C i vremenu zadržavanja 10 min, dok je minimalna koncentracija detektirana pri najmanjoj temperaturi i najkraćem vremenu zadržavanja te je iznosila 0,50 g L⁻¹. Povećanjem temperature na 180°C, koncentracije mravlje kiseline kreću se u rasponu od 0,57 g L⁻¹ do 1,48 g L⁻¹. Ovaj trend prati i udio lignina topivog u kiselini, koji s minimalnog udjela od 1,06%, povećanjem temperature raste na maksimalnih 1,65% pri temperaturi od 200°C i vremenu zadržavanja 10 min.

Slika 20. prikazuje rezultate analize sastava čvrstih faza kiselinski predobrađenih kukuruznih oklasaka dobivenih nakon provedene dvostupanjske kiselinske hidrolize. I ovdje se može primijetiti da je udio glukana iz početne sirovine prisutan u značajnije većem udjelu nego u tekućoj fazi hidrolizata, ali i on se smanjuje s povećanjem temperature i vremena zadržavanja što ukazuje na postepenu hidrolizu celuloze. Maksimalan udio glukana od 96,89% detektiran je pri 160°C i vremenu zadržavanja 1 min. Ostali udjeli glukana kod ove temperature i vremenima zadržavanja 5 min i 10 min, su 96,20% i 96,43%. Povećanjem temperature dolazi i do smanjenja udjela glukana tako pri temperaturi od 180°C i odgovarajućim vremenima zadržavanja oni iznose 91,69%, 90,51% i 87,38%, a pri 200°C oni padaju na vrijednosti od 79,58%, 70,59% i 58,66%. Udjeli ksilana i arabinana u čvrstoj fazi hidrolizata smanjuju se s povećanjem temperature, te su ujedno i manji od onih u tekućoj fazi. Udjeli ksilana iz početne sirovine u predtretiranim kukuruznim oklascima dobivenima nakon predobrade pri 160°C iznose 44,63%, 43,72% i 42,62%, pri 180°C udjeli su 32,50%, 12,00% i 2,34%, a pri 200°C oni su 27,33%, 10,02% i 5,58% za vremena zadržavanja 1 min, 5 min i 10 min. Udjeli arabinana se kreću od minimalnih 5,54% pri najvećoj temperaturi od 200°C i najdužem vremenu

zadržavanja, do maksimalnih 23,29% pri 160°C i najkraćem vremenu zadržavanja. Slika 20. ujedno prikazuje i prividan rast udjela LNTK povećanjem temperature i vremena zadržavanja, što je primijećeno i kod sastava ostalih krutih faza hidrolizata proučavanih lignoceluloznih sirovina. Maksimalan udio LNTK od 31,69% detektiran je pri najekstremnijim uvjetima predobrade, temperaturi 200°C i vremenu zadržavanja 10 min. Sastav krute faze sličan je onima dobivenima nakon predobrade oklasaka i kasnije enzimske hidrolize u sličnim istraživanjima (Kharina i sur., 2020; Pointner i sur., 2014).

5.1.2. Procjena uspješnosti i optimizacija bioloških postupaka obrade predobrađenih kukuruznih oklasaka pomoću odabranih komercijalnih enzimskih pripravaka

Sirovina u svim eksperimentima enzimske hidrolize bili su prethodno predobrađeni kukuruzni oklasci dobiveni nakon kiselinske hidrolize s 0,5% m vol⁻¹ sumpornom kiselinom u visokotlačnom reaktoru na 180°C kroz 10 min. Ova sirovina je odabrana zbog svog sastava u kojem je udio glukana iz početne sirovine bio 87,38% (0,32 g_{glukana} g_{sirovine}⁻¹), udio ksilana 2,37% (0,08 g_{ksilana} g_{sirovine}⁻¹) i udio arabinana 6,54% (0,00048 g_{arabinana} g_{sirovine}⁻¹), što ukazuje na gotovo potpunu hidrolizu hemiceluloze. Sirovina sadrži i lignin čiji sastojci degradacije mogu negativno djelovati na celulolitičke enzime (Limayem i Ricke, 2012). Enzimska hidroliza usitnjenih i osušenih predobrađenih kukuruznih oklasaka (PKO) provedena je pomoću komercijalnih enzima Cellulase, enzyme blend i Viscozyme L u acetatnom puferu pri 50°C (Poglavlje 3.2.2.).

Kako bi se odredio stupanj hidrolize koji se može postići primjenom Cellulase, enzyme blend provedena je enzimska hidroliza PKO. Ovisnost uspješnosti enzimske hidrolize PKO o koncentraciji sirovine i volumnom udjelu Cellulase, enzyme blenda i o vremenu trajanja procesa prikazana je na Slici 21.

Hidrolizom 10 g L⁻¹ PKO pomoću 1% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blenda nakon 48 h oslobođeno je 60,59% ukupnih šećera iz sirovine, te je postignut stupanj hidrolize glukana i ksilana od 73,11%, odnosno 52,93%. Povećanjem koncentracije enzima (s 1% vol vol⁻¹ na 10% vol vol⁻¹ i 20% vol vol⁻¹) postignuti su stupnjevi hidrolize ukupnih ugljikohidrata iz početne sirovine od 80,67% i 79,82%, ujedno su postignuti i maksimalni mogući stupnjevi hidrolize glukana od 100%. Pri koncentraciji enzima 10% vol vol⁻¹ maksimalan stupanj hidrolize glukana postignut je unutar 4 sata, dok je pri 20% vol vol⁻¹ enzima on postignut unutar 2 h. Pri istim koncentracijama enzima na kraju procesa postignuti su stupnjevi hidrolize ksilana 45,18% i 34,58%, što ukazuje na znatno sporiju hidrolizu ksilana.

Povećanjem koncentracije PKO na 20 g L⁻¹, te korištenjem istih koncentracija enzima 1% vol vol⁻¹, 10% vol vol⁻¹ i 20% vol vol⁻¹ nakon 48 h, dobiveni su stupnjevi hidrolize ukupnih ugljikohidrata 39,99%, 80,52% i 79,53%. Stupnjevi hidrolize glukana dobiveni su u rasponu od 47,87% do 100%. Pri koncentraciji enzima 10% vol vol⁻¹ i 20% vol vol⁻¹ postignuti su maksimalni stupnjevi hidrolize glukana 100% unutar 3 h odnosno 1 h.. Stupnjevi hidrolize

ksilana 38,55%, 43,27% i 34,58% dobiveni su na kraju procesa pri zadanim koncentracijama enzima.

Pri najvećoj koncentraciji PKO od 40 g L⁻¹ vidljiv je sličan trend ovisnosti uspješnosti enzimске hidrolize o različitim volumnim udjelima enzima. Tako je maksimalan stupanj hidrolize ukupnih šećera na kraju procesa od 80,16% zabilježen primjenom 10% vol vol⁻¹ enzima. Smanjenjem koncentracije enzima dolazi i do skoro dvostrukog smanjenja stupnja hidrolize na 34,79%, dok se povećanjem koncentracije enzima na 20% vol vol⁻¹ dobije stupanj hidrolize 79,31%. Za postizanje maksimalnih stupnjeva hidrolize glukana od 100% bilo je potrebno 2 do 6 h, ovisno da li je koncentracija enzima bila 20% vol vol⁻¹ ili 10% vol vol⁻¹. Pri ovoj koncentraciji sirovine stupnjevi hidrolize ksilana za koncentracije enzima od 1% vol vol⁻¹, 10% vol vol⁻¹ i 20% vol vol⁻¹ iznosili su 27,27% 38,85% i 31,03%. Jednak trend smanjenja stupnja hidrolize ksilana primijećen je i usporedbom s preostalim testiranim koncentracijama supstrata prilikom povećanja koncentracije enzima s 10% na 20% vol vol⁻¹. Takav trend smanjenja stupnja hidrolize dobili su i Abedinifar i sur. (2009) prilikom hidrolize rižine slame pomoću celulaza i β -glukozidaze. Enzimskom hidrolizom 20 g L⁻¹ predobrađene rižine slame postigli su stupanj hidrolize od 71,8%, a povećanje koncentracije supstrata na 50 g L⁻¹ i 100 g L⁻¹ postigli su stupanj hidrolize od 62,0% i 59,9%.

Usporedbom navedenih rezultata može se primijetiti da je hidroliza ksilana znatno sporija od hidrolize glukana s Cellulase, enzyme blend. Sav sadržaj glukana hidroliziran je unutar 1 do 6 h, ovisno o koncentraciji supstrata i enzima, dok je u jednakim uvjetima maksimalan stupanj hidrolize ksilana postignut tek za 48 h pri svim testiranim uvjetima. Niski stupanj hidrolize ksilana može biti posljedica razgranate strukture samog ksilana i prisutnosti različitih bočnih ogranaka i grupa zbog čega je djelovanje enzima otežano (van Eylen i sur., 2011). Prema istraživanju enzimске hidrolize predtretirane rižine slame, brjestovine i borovine s Cellic CTec2 i Cellic HTec2 (20 FPU g⁻¹), hidroliza glukana je znatno sporija. Nakon 72 h enzimске hidrolize, Satari i sur. (2016) postigli su stupanj hidrolize glukana od 99% (rižina slama), 99% (brjestovina) i 84% (borovina). Također je dokazano da produljenje vremena enzimске hidrolize ne dovodi do značajne promjene u stupnju hidrolize ukupnih ugljikohidrata (6 h i 48 h). Pošto su Cellic CTec2 i Cellic HTec2 slična kombinacija enzima kao i Cellulase, enzyme blend, može se usporediti ukupni stupanj enzimске hidrolize predobrađene rižine slame primjenom navedenih enzima. Jednak stupanj hidrolize (79%) ostvaren je unutar prva 3 h enzimskom hidrolizom rižine slame s 20 FPU g⁻¹ (Satari i sur., 2016). Iste mješavine enzima

koristili su i Kharina i sur. (2020) u svom istraživanju, te njihovi rezultati pokazuju da maksimalan prinos ukupnih ugljikohidrata od 45% moguće postići upotrebom 3% CellicCTec2 nakon 96 h trajanja procesa enzimske hidrolize.

Enzimska hidroliza PKO provedena je i pomoću Viscozyme L. Ispitan je efekt povećanja koncentracije supstrata i enzima na ukupnu hidrolizu odabrane sirovine. Rezultati stupnjeva hidrolize ukupnih šećera prikazani su u ovisnosti o različitim koncentracijama enzima kao i o vremenu trajanja procesa na Slici 22.

Nakon provedene enzimske hidrolize 10 g L⁻¹ PKO s volumnim udjelima enzima od 1%, 10% i 20% dobiveni su stupnjevi hidrolize ukupnih ugljikohidrata od 20,59%, 36,16% i 28,76%. Stupnjevi hidrolize glukana iznose 16,18%, 36,47% i 26,86%, dok su stupnjevi hidrolize ksilana znatno veći i iznose 94,82%, 100% i 100%. Maksimalna uspješnost hidrolize ksilana pri koncentraciji sirovine od 10 g L⁻¹ i koncentraciji enzima od 10% vol vol⁻¹ i 20% vol vol⁻¹ postignuta je već nakon 6 h odnosno 2 h.

Hidrolizom 20 g L⁻¹ PKO stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata nakon 48h pri najmanjoj koncentraciji enzima iznosio je 16,45%. Povećanjem koncentracije Viscozyme L na 10% i 20% vol vol⁻¹ dolazi i do porasta stupnja hidrolize ukupnih šećera na 24,53% i 26,32%. Uslijed povećanja koncentracije PKO došlo je do smanjenja stupnja hidrolize glukana u usporedbi s manjom koncentracijom sirovine od 10 g L⁻¹, te se oni kreću u rasponu od 11,57% do 23,69%, no i pri ovim uvjetima zabilježen je veći stupanj hidrolize ksilana. On je pri volumnom udjelu enzima od 1% iznosio 78,63%, te daljnjim povećanjem koncentracije enzima dostiže i maksimalan stupanj hidrolize od 100%. Ovaj maksimum je pri 10% vol vol⁻¹ postignut nakon 48 h, dok je pri većem udjelu Viscozima L dobiven već nakon 4 h, što je sporije u usporedbi s rezultatima dobivenim kod hidrolize 10 g L⁻¹ PKO.

Daljnjim povećanjem koncentracije sirovine na 40 g L⁻¹ PKO dolazi do smanjenja stupnjeva hidrolize ukupnih ugljikohidrata u usporedbi s rezultatima dobivenih za 10 g L⁻¹ i 20 g L⁻¹ sirovine. Pri volumnom udjelu enzima od 1% dobiven je stupanj hidrolize od 13,88%. Povećanjem koncentracije Viscozima L na 10% vol vol⁻¹ raste i stupanj hidrolize ukupnih šećera na 22,71%, dok pri najvećem volumnom udjelu enzima od 20%, on iznosi 23,36%. Uspoređujući stupnjeve hidrolize glukana i ksilana s vrijednostima za dvije niže koncentracije PKO, vidljivo je njihovo smanjenje. Stupanj hidrolize glukana kreće se u rasponu od 10,94% pri najnižem volumnom udjelu enzima, do 18,28% pri 20% vol vol⁻¹ Viscozima L. Iako su stupnjevi hidrolize glukana i dalje veći od stupnjeva hidrolize glukana, primjetan je njihov pad.

Pri 1% vol vol⁻¹ enzima stupanj hidrolize ksilana je 39,93%, pri 10% vol vol⁻¹ postiže vrijednost od 95,57%, dok je maksimalna vrijednost od 100% postignuta pri najvećoj koncentraciji Viscozyme L nakon 8 h trajanja procesa.

U svim eksperimentima enzimске hidrolize pomoću Viscozyme L dobiven je puno veći stupanj hidrolize ksilana od stupnja hidrolize glukana. Razlog takvog rezultata je što Viscozyme L sadrži veću koncentraciju ksilanaza od celulaza. Iako su postignuti veliki stupnjevi hidrolize ksilana, zbog malih stupnjeva hidrolize glukana, hidroliza ukupnih ugljikohidrata je u niskom rasponu od 13,89% (1% vol vol⁻¹ enzima i 40 gL⁻¹ PKO) do 36,16% (10% vol vol⁻¹ enzima i 10 gL⁻¹ PKO). Povećanjem koncentracije enzima s 10% vol vol⁻¹ na 20% vol vol⁻¹ postignuti su gotovo jednaki stupnjevi hidrolize ukupnih ugljikohidrata. Za usporedbu, Sahare i sur. (2012) proveli su enzimsku hidrolizu alkalno predobrađenih kukuruznih oklasaka pomoću komercijalnih enzima Palkofeel-30 i AccelleraseTM1000 koji posjeduju približnu ksilanaznu aktivnost kao Viscozyme L. Kod hidrolize provedene s Palkofeel-30 (5 FPU g⁻¹ supstrata) dobiven je stupanj enzimске hidrolize u rasponu od 39% (2,5% m vol⁻¹ supstrata) do 19% (7,5% m vol⁻¹ supstrata). Povećanjem koncentracije enzima na 20 FPU g⁻¹ supstrata dovelo je do povećanja stupnja hidrolize na 61% (2,5% m vol⁻¹ supstrata) i 39% (7,5% m vol⁻¹ supstrata). Hidrolizom 2,5% m vol⁻¹ supstrata pomoću 20 FPU g⁻¹ AccelleraseTM1000 postignuta je 100%-tna hidroliza, ali povećanjem supstrata na 7,5% m vol⁻¹ dovelo je do značajnog smanjenja hidroliza na 39% (Sahare i sur., 2012).

Na temelju stupnjeva hidrolize glukana postignutih pomoću Cellulase, enzyme blend vidljiv je znatno veći stupanj hidrolize u usporedbi s rezultatima dobivenih pomoću Viscozyme L. Razlog tome je različita aktivnost celulaza i ksilanaza u komercijalnim enzimima. Također, stupnjevi hidrolize ksilana s Viscozyme L znatno su veći od hidrolize ksilana s Cellulase, enzyme blend. Usporedbom stupnjeva hidrolize ukupnih ugljikohidrata, veći stupnjevi hidrolize dobiveni su pomoću Cellulase, enzyme blend (od 34,79% do 80,67%) u usporedbi s Viscozyme L (od 13,89% do 36,16%). Razlog nepotpunoj hidrolizi početne sirovine prema istraživanju Xiao i sur. (2004) može biti pojava inhibicije enzima. Uzrok nepotpune hidrolize je nakupljanje proizvoda enzimске hidrolize (npr. glukoze, ksiloze, manoze i galaktoze) koji djeluju inhibirajuće na same enzime. Nakon uklanjanja dobivenih produkata, početna sirovina je hidrolizirana u potpunosti. Budući da enzimi korišteni u sklopu ovog istraživanja također ne hidroliziraju početnu sirovinu u potpunosti, može se pretpostaviti da su oni tijekom ovog

procesa inhibirani krajnjim proizvodima te da zbog toga ne provode potpunu hidrolizu PKO do monomernih jedinica.

S obzirom na rezultate hidroliza sa zasebnim enzimima, zaključeno je da testirani enzimski pripravci postižu različite stupnjeve hidrolize ukupnih ugljikohidrata. Kako bi se odredilo može li se s kombinacijom enzimskih pripravaka postići veći stupanj hidrolize i samim time iskoristio sav potencijal sirovine, provedena je enzimska hidroliza PKO pomoću mješavine komercijalnih enzima Cellulase, enzyme blend i Viscozyme L. Ispitana je ovisnost uspješnosti ukupne enzimske hidrolize o koncentracije enzima i supstrata. Rezultati uspješnosti hidrolize različitih koncentracija sirovine djelovanjem kombinacije enzima prikazani su na Slici 23. Svi stupnjevi hidrolize ukupnih ugljikohidrata izraženi su na masu ukupnih šećera iz sirovine, no da su računani na ukupnu masu sirovine, potpunu (100%) hidrolizu nije moguće postići zbog prisutnosti lignina u PKO.

Uvidom u rezultate vidljivo je da je upotrebom 1% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 1% vol vol⁻¹ Viscozyme L pri koncentraciji PKO od 10 g L⁻¹ dobiven stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata od 54,12% nakon 48 h trajanja procesa. Stupanj hidrolize glukana iznosio je 57,38%, dok je na kraju procesa postignut stupanj hidrolize ksilana od 100%. Povećanjem volumnog udjela enzima na 2% Cellulase, enzyme blend i 5% Viscozyme L, dolazi i do povećanja stupnja hidrolize ukupnih šećera, odnosno rezultati pokazuju da je došlo do potpune hidrolize ugljikohidrata prisutnih u sirovini. Maksimalni stupnjevi hidrolize glukana i ksilana od 100% postignuti su nakon 48 h odnosno 2 sata trajanja procesa. Daljnjim povećanjem koncentracije enzima na 5% vol vol⁻¹ Cellulase blend i 10% vol vol⁻¹ Viscozyme L, postignuta je potpuna hidroliza ugljikohidrata već nakon 6 h, ovo povećanje koncentracije enzima ujedno i ubrzava postizanje maksimalnih stupnjeva hidrolize glukana i ksilana od 100% nakon 6 h odnosno 2 h trajanja procesa hidrolize.

Enzimskom hidrolizom 20 gL⁻¹ PKO s 1% vol vol⁻¹ Viscozyme L i 1% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend, nakon 48 h trajanja procesa enzimske hidrolize postignut je stupanj hidrolize ukupnih šećera od 49,76%. Pri ovoj koncentraciji sirovine i enzima, ne dolazi do potpune hidrolize glukana i ksilana, već su na kraju procesa zabilježeni stupnjevi hidrolize glukana i ksilana od 56,61% i 61,52%. Povećanjem volumnog udjela enzima na 2% Cellulase, enzyme blend i 5% Viscozyme L, odnosno 5% i 10%, postignuti su stupnjevi hidrolize ukupnih ugljikohidrata od 100% u različitim vremenskim intervalima. Tako je maksimalan stupanj hidrolize kombinacijom 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5% vol vol⁻¹ Viscozyme L postignut nakon 48 h, dok je upotrebom 5% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 10% vol vol⁻¹

Viscozyme L dostignut u kraćem vremenskom periodu od 8 h trajanja procesa. Pri ovim koncentracijama enzima postignuti su i stupnjevi hidrolize glukana i ksilana od 100%, nakon 48 h odnosno 4 h u oba slučaja.

Analizom rezultata hidrolize 40 g L⁻¹ PKO na kraju procesa dobiveni su stupnjevi hidrolize ukupnih ugljikohidrata 48,29% upotrebom 1% vol vol⁻¹ Viscozyme L i 1% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend, 80,67% kombinacijom 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5% vol vol⁻¹ Viscozyme L, te 84,88% primjenom najviših volumnih udjela komercijalnih enzima od 5% i 10%. Usporedbom stupnjeva hidrolize glukana, može se vidjeti kako povećanje volumnog udjela enzima ujedno djeluje i na povećanje stupnja hidrolize. Pri najmanjoj koncentraciji enzima tako je postignut stupanj hidrolize glukana 54,37%, povećanjem volumnih udjela Cellulase, enzyme blend i Viscozyme L na 2% i 5% dolazi i do porasta stupnja hidrolize glukana na 94,25%, dok daljnje povećanje koncentracije enzima dovodi do neznatnog povećanja stupnja hidrolize glukana na 99,72%. Razlog takvog rezultata može biti u nemogućnosti molekula enzima da prodru pri većim koncentracijama kroz supstrat, što dovodi do ograničenog prijenosa mase i smanjenja stupnja hidrolize (Althuri i Banerjee, 2019). Stupnjevi hidrolize ksilana prate sličan trend, te je tako minimalan stupanj 60,71% postignut i pri najmanjoj koncentraciji enzima, dok povećanje volumnog udjela enzima dovodi i do potpune hidrolize ksilana. Pri 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5% vol vol⁻¹ Viscozyme L maksimum je postignut nakon 8 h procesa hidrolize, dok je pri 5% i 10% za to trebalo kraće vrijeme od 4 h.

Usporedbom rezultata provedenih enzimskih hidroliza s pojedinačnim enzimima i kombinacijom enzima mogu se primijetiti razlike u postignutim stupnjevima hidrolize ukupnih šećera. Primjenom kombinacije 1% vol vol⁻¹ Viscozyme L i 1% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend za hidrolizu 20 g L⁻¹ i 40 g L⁻¹ PKO postignuti su stupnjevi hidrolize 49,76% i 48,29%. U usporedbi s rezultatima dobivenima za hidrolizu PKO primjenom 1% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blenda, ove vrijednosti su veće za oko 1,3 puta. No kod hidrolize 10 g L⁻¹ sirovine veći stupanj hidrolize zabilježen je kod primjene 1% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i iznosio je 60,58%, dok je kod kombinacije enzima on bio 54,11%. Upotrebom volumnog udjela Viscozyme L od 1%, postignuti su najmanji stupnjevi hidrolize ukupnih ugljikohidrata 20,59%, 16,45% i 13,89%.

Nakon hidrolize 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ i 40 g L⁻¹ sirovine s kombinacijom 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5% vol vol⁻¹ Viscozyme L dobiveni su stupnjevi hidrolize ukupnih

šećera 100%, 100% i 80,67%, a daljnje povećanje volumnog udjela enzima na 5% Cellulase, enzyme blend i 10% Viscozyme L dovodi do potpune hidrolize 10 g L⁻¹ i 20 g L⁻¹ PKO i stupnja hidrolize 84,88% za najveću koncentraciju sirovine. U usporedbi sa zasebnim enzimima ovi stupnjevi hidrolize su veći. Stupnjevi hidrolize 20 g L⁻¹ PKO s 10% Cellulase, enzyme blend kretali su se u rasponu od 80,16% do 80,67%, dok daljnje povećanje koncentracije Cellulase, enzyme blenda na volumni udio 20% dovodi do neznatnog pada vrijednosti stupnjeva hidrolize na 79,82% 79,53% i 79,31%. Uspoređujući ove vrijednosti s onima dobivenima kod upotrebe Viscozyma L može se vidjeti da su one veće 2 do 4 puta, ovisno o početnoj koncentraciji sirovine.

Analizom svih dobivenih stupnjeva hidrolize ukupnih šećera iz svih provedenih eksperimenata enzimske hidrolize PKO, najbolji rezultati dobiveni su primjenom kombinacija enzima volumnog udjela od 2% Cellulase, enzyme blend i 5% Viscozyme L te 5% Cellulase, enzyme blend i 10% Viscozyme L. Pošto povećanje koncentracije oba enzima nije doprinijelo povećanju stupnja hidrolize ukupnih ugljikohidrata, važno je uzeti u obzir da troškovi procesa rastu utroškom veće koncentracije enzima. Do jednakog zaključka došli su i Althuri i Banerjee (2019) koji su proveli enzimsku hidrolizu mješavine lignoceluloznih sirovina te su naveli da prevelika koncentracija enzima samo drastično povećava troškove procesa, a ne mora nužno povećati njegovu efikasnost. Jedan od mogućih razloga lošije hidrolize može biti i lignin prisutan u PKO jer lignin može smanjivati stupanj hidrolize zbog djelovanja na aktivnost celulaznih enzima i zbog ograničenja dostupnosti celuloze za enzimsku hidrolizu. Nadalje, razgradnjom lignina nastaju fenolni spojevi koji inhibiraju celulolitičke enzime i time negativno utječu na hidrolizu (Limayem i Ricke, 2012; B. Yang i sur., 2011; B. Yang i Wyman, 2008).

Rezultati enzimske hidrolize 40 g L⁻¹ PKO pomoću kombinacije komercijalnih enzimskih pripravaka Cellulase, enzyme blend i Viscozyme L korišteni su za optimizaciju procesa hidrolize u programskom sustavu DesignExpert. Unosom vrijednosti za stupnjeve hidrolize ukupnih ugljikohidrata u ovisnosti o vremenu i volumnom udjelu enzima, dobiveni su rezultati prikazani u Tablici 12. Prema ovim rezultatima maksimalan prinos od 92,66% ugljikohidrata moguće je postići za 48 h korištenjem smjese komercijalnih enzima sastavljene od 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L. Uspoređujući ove vrijednosti s rezultatima enzimske hidrolize 40 g L⁻¹ PKO kombinacijom 2% Cellulase blend i 5% Viscozyme L, vidi se povećanje stupnja hidrolize ugljikohidrata za 1,15 puta. Kako bi se ispitala točnost ovih podataka, napravljena je enzimska hidroliza PKO koristeći parametre dobivene iz DesignExperta. Hidroliza je vođena kroz 48 h na različitim temperaturama, u različitim medijima (acetatni pufer i MHP) uz kombinaciju 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L. Prema uputama proizvođača korištenih enzimskih pripravaka, enzimsku hidrolizu najbolje je provoditi u puferu. Međutim, budući da je svrha provedenog procesa enzimske hidrolize bila odrediti kako temperatura i vrijeme utječu na uspješnost hidrolize sirovine kako bi se mogla provoditi simultano uz uzgoj radnog mikroorganizma u većem mjerilu, osim preporučenog pufera koristila se i MHP koja simulira stvarnu podlogu. Dobiveni rezultati izraženi su kao stupnjevi hidrolize ukupnih ugljikohidrata u odnosu na njihove udjele u početnoj sirovini, a prikazani su na Slici 24.

Acetatni pufer u ovim eksperimentima koristio se kao optimalna podloga za aktivnost korištenih enzimskih pripravaka prema uputama proizvođača. Slika 24a prikazuje rezultate ovisnosti uspješnosti enzimske hidrolize 40 g L⁻¹ PKO u ovisnosti o temperaturi i vremenu trajanja procesa djelovanjem mješavine 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L. Iz rezultata je evidentno da sa smanjenjem temperature dolazi i do pada efikasnosti hidrolize. Nakon 48h, potpuna hidroliza ugljikohidrata iz sirovine postignuta je pri temperaturi od 50°C. Rezultati enzimske hidrolize PKO s NaOH na temperaturi od 50°C uz Celluclast 1.5L i Viscozyme L u periodu od 48 h pokazali su iskorištenje glukana od 52,69% i ksilana od 62,84% (Ivančić Šantek i sur. 2018) što je manje u odnosu na rezultate dobivene tijekom ovih eksperimenata provedenih kod iste temperature. Snižavanje temperature na 40°C dovodi do smanjenja stupnja hidrolize ukupnih ugljikohidrata na 62,68%. Provođenje procesa na optimalnoj temperaturi za uzgoj radnog mikroorganizma od 30°C, uzrokuje još veće smanjenje uspješnosti hidrolize. Stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata pri ovim je uvjetima 3 puta manji od maksimuma zabilježenog pri 50°C, i dvostruko manji od stupnja hidrolize

dobivenog pri 40°C. Daljnje snižavanje temperature na 20°C, rezultiralo je konačnim stupnjem hidrolize ukupnih šećera od samo 22,43%.

Na Slici 24b prikazani su rezultati uspješnosti enzimske hidrolize provedene u MHP. Enzimska hidroliza provodila se u MHP kao simulaciji podloge kako bi se uvidjelo koliko njezin sastav utječe na efikasnost enzima. Kombinacijom 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L vidi se sličan utjecaj temperature na stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata kao i kod procesa provedenog u acetatnom puferu. S obzirom da je optimalna temperatura za rast većine radnih mikroorganizama u biotehnološkim proizvodnjama do 30°C, enzimska hidroliza je provedena i pri nižoj temperaturi od 20°, te pri većoj temperaturi od 40°C. U usporedbi s hidrolizom provedenom u acetatnom puferu, pri 40°C došlo je do potpune hidrolize PKO do monomernih šećera, te je postignut stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata 100%, no snižavanje temperature dovodi do značajnog smanjenja uspješnosti hidrolize, te stupnjevi hidrolize ukupnih šećera pri 30°C i 20°C iznose 40,03% i 15,29%, što je u usporedbi s vrijednostima dobivenima u procesu provedenim u puferu pri istim temperaturama razlika od + 7,05% odnosno -7,14%.

Usporedbom provedenih enzimskih hidroliza u puferu i u MHP uočava se da je temperatura od 20°C preniska za provođenje efikasne enzimske hidrolize. Najveći stupanj hidrolize pri 20°C postignut je u acetatnom puferu gdje je nakon 48 sati vođenja procesa stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata iznosio 22,43%, što nije zadovoljavajući rezultat za prijenos u veće mjerilo. Na temperaturi od 30°C postignuti su dobri rezultati, posebice u MHP gdje je stupanj hidrolize ukupnih šećera iznosio 40,03%, za razliku od pufera gdje je iznosio 32,98%. Kod procesa vođenih na temperaturi od 40°C dobiveni rezultati za MPH i pufer pokazuju odstupanja, naime stupanj hidrolize u MHP je 100% dok je u acetatnom puferu on iznosio 62,68%. Veća iskorištenja hidrolize dobivena su u MHP, što se postavlja kao prednost u odnosu na podlogu s puferom, budući da MHP simulira podlogu na kojoj će se kasnije provoditi proces simultane enzimske hidrolize i fermentacije.

5.1.3. Rezultati istraživanja uzgoja odabranih vrsta plijesni za procjenu lignocelulolitičke aktivnosti i proizvodnju lignocelulolitičkih enzima

Preliminarna procjena enzimске aktivnosti provedena je pomoću testa na Petrijevoj zdjelici u karboksimetil celuloznom agaru uz dodatak sintetskog bojila Kongo crvenila (Poglavlje 3.2.3.). Sedam kultura koje su podvrgnute ovom testu na temelju obrazaca rasta pokazale su određeni stupanj razgradnje boje. Izmjereni promjer područja rasta micelija varirao je ovisno o soju. Rezultati su prikazani u Tablici 13. *F. oxysporium* i *F. verticillioides* stvorili su najšire bistro zone, s EI vrijednošću od 1,1 odnosno 1,09, dok je najniža vrijednost EI od 1,01 uočena kod *M. indicus*. Svi ostali sojevi imali su vrijednost EI između ovih vrijednosti, *B. dothidea* 1,07; *P. variotii* 1,05; *M. thermophila* 1,03; *T. terrestris* 1,03. Literatura izvještava o sličnim vrijednostima za gljive iz roda *Mucor*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* ili srodnih sojeva (Nait M'barek i sur., 2019; Saroj i sur., 2018; Florencio i sur., 2012; Pečiulytė, 2007). Ovi podaci sugeriraju da ove plijesni mogu koristiti CMC kao jedini izvor ugljika, što ujedno ukazuje na mogućnost korištenja celuloze kao supstrata.

Većina studija o učinku hranjive podloge na proizvodnju enzima fokusirana je na zamjenu izvora ugljika ili dušika (Schneider i sur., 2018; An i sur., 2016; F. Wang i sur., 2016; Bertolin i sur., 2003; Papinutti i Lechner, 2008; Kachlishvili i sur., 2006). Kako bi se ispitalo djelovanje lignocelulolitičkih sirovina kao induktora proizvodnje enzima, testirane su 4 različite hranjive podloge (Tablica 6.) jednostavnom usporedbom specifične enzimске aktivnosti. U medije je kao induktor sinteze proizvodnje lignocelulolitičkih enzima dodana PKO, te su na takvim medijima metodom sekvencionalnog uzgoja na čvrstoj i u submerznoj fazi (eng. „sequential solid state and submerged fermentation“) uzgajane prethodno testirane kulture plijesni kako bi se odredio optimalni medij za indukciju proizvodnje enzima. Nakon provedenog uzgoja određene su specifične aktivnosti za neke klase celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima (endo- i egzogukanaze; ksilanaze; mananaze; arabinaze; pektinaze) i druge enzime koji bi se mogli eksprimirati i pokazati aktivnost na odabranoj prethodno obrađenoj sirovini (celobioza dehidrogenaza (CDH); lakaza. i lignin peroksidaza (LiP)) (Slika 25.). Fermentacije su provedene u duplikatu, a standardne devijacije specifične aktivnosti bile su manje od 10%.

Ispitivanje uzoraka nakon uzgoja na aktivnost škrob degradirajućih enzima, hemicelulolitičku i celulolitičku aktivnost pokazalo je da sve testirane plijesni imaju određenu

razinu enzimske aktivnosti (Slika 25.). Najvažniji enzimi koji razgrađuju hemicelulozu su ksilanaze, arabinaze i mananaze (Andlar i sur., 2018). Nekoliko studija bavilo se istraživanjem utjecaja različitih parametara na proizvodnju ksilanaza (Abdullah i sur., 2015; Fortes Gottschalk i sur., 2013; Bakri i sur., 2010; Lúcia Garcia Simões i sur., 2009; S. Q. Yang i sur., 2006). Najveće vrijednosti specifičnih ksilanaznih aktivnosti u svim ispitivanim medijima zabilježene su u uzorcima dobivenima nakon uzgoja *F. oxysporum*, *F. verticillioidea* i *B. dothidea*. Maksimalna ksilanazna aktivnost određene je u uzorcima uzgoja *F. verticillioidea*. Prosječne ksilanazne aktivnosti kretale su se od 2,53 U mg⁻¹_{uk. proteina} u mediju 4, do 6,48 U mg⁻¹_{uk. proteina} u mediju 1, s malim razlikama u usporedbi s medijima 2 i 3 (6,35 U mg⁻¹_{uk. proteina} i 6,18 U mg⁻¹_{uk. proteina}). Ako se ove vrijednosti ksilanazne aktivnosti usporede s onima o kojima je izvijestio Saha (2001), može se primijetiti da su one veće. Ksilanazna aktivnost u supernatantu kulture *F. verticillioidea*, uzgajane na ksilanu kukuruznih vlakana kao izvoru ugljika, iznosila je 1,3 U mg⁻¹. Uzorci supernatanta dobivenog nakon uzgoja *F. oxysporum* i *B. dothidea* postigli su nešto niže aktivnosti ksilanaze, u rasponu od 2,25 U mg⁻¹_{uk. proteina} do 2,88 U mg⁻¹_{uk. proteina} za *F. oxysporum* i od 2,17 U mg⁻¹_{uk. proteina} do 5,64 U mg⁻¹_{uk. proteina} za *B. dothidea*. Uspoređujući ove vrijednosti specifičnih aktivnosti s radom Arabi i sur. (2011), vidljivo je da su one veće. U njihovom istraživanju ispitana je proizvodnja ksilanaze 21 izolata iz roda *Fusarium* sp. Koristeći poljoprivredni otpad kao sirovinu. Najveću zabilježenu ksilanaznu aktivnost od 0,91 U mg⁻¹ postigla je *F. solani* SYRN7, dok je *F. verticillioidea* pokazala znatno nižu aktivnost od 0,139 U mg⁻¹. Supernatanti *F. verticillioidea*, *F. oxysporum* i *B. dothidea* također su pokazali najveću specifičnu arabinaznu aktivnost među svim testiranim sojevima, s maksimalnim vrijednostima postignutima u mediju 4, najmanju 1,51 U mg⁻¹_{uk. proteina} u supernatantu *B. dothidea*, a najveću 2,51 U mg⁻¹_{uk. proteina} supernatant *F. verticillioidea*. Uspoređujući aktivnosti mananaze, najbolji je proizvođač *F. verticillioidea*, 2,35 U mg⁻¹_{uk. proteina}, a zatim *F. oxysporum*, sa specifičnom aktivnošću 2,08 U mg⁻¹_{uk. proteina}.

Za razgradnju celuloze potrebno je sinergističko djelovanje nekoliko vrsta enzima od kojih su najvažnije endo- i egzo-glukanaza (Andlar i sur., 2018). Njihova proizvodnja bila je fokus nekoliko istraživanja, u kojima su, ovisno o korištenom soju i sirovini, dobivene različiti rasponi njihove aktivnosti (Heidary Vinche i sur., 2021; S. Yang i sur., 2008; Martin i sur., 2007; Shu i sur., 2006; OGel i sur., 2001). Rezultati specifičnih aktivnosti za navedene enzime u ovisnosti o korištenoj hranjivoj podlozi prikazani su na Slici 25. Uspoređujući rezultate, vidljivo je da *F. oxysporum*, *F. verticillioidea* i *B. dothidea* imale najveću ukupnu prosječnu aktivnost egzo- i endo-glukanaze. Najveće specifične endoglukanaze aktivnosti određene su u

mediju 4, te variraju od 0,51 U mg⁻¹_{uk. proteina} za *B. dothidea* do 1,45 U mg⁻¹_{uk. proteina} za *F. verticillioides*, dok su minimalne vrijednosti aktivnosti ovih enzima otkrivene u mediju 1. Aktivnosti egzoglukanaze bile su komparativno visoke u svim testiranim medijima, s maksimalnom postignutom vrijednošću od 2,76 U mg⁻¹_{uk. proteina} u mediju 2 u kojem je uzgajan *F. oxysporum*, a slijede aktivnosti dobivene u mediju 4 od 1,83 U mg⁻¹_{uk. proteina}, 2,11 U mg⁻¹ i 2,0 U mg⁻¹_{uk. proteina} koje su izmjerene za *B. dothidea*, *F. verticillioides*, odnosno *F. oxysporum*. Sekret *F. verticillioides* bio je fokus istraživanja poboljšanja uspješnosti saharifikacije pšenične slame koje su proveli Ravalason i sur. (2012). Njihovi rezultati pokazuju da *F. verticillioides* ima hemicelulolitičku i pektinaznu aktivnost, no nisu zabilježeni celololitički enzimi, što odudara od rezultata dobivenih u ovom radu. U sličnom istraživanju, deb Dutta je sa svojim suradnicima (2018) analizirao celololitičku aktivnost nekih vrsta iz roda *Fusarium* korištenjem različitih metoda. Različiti sojevi *F. oxysporum* pokazali su visoku aktivnost CMCaze (0,445 IU ml⁻¹) i aktivnosti FPaze (9,25 IFPU ml⁻¹). Dva do deset puta manje specifične aktivnosti enzima, u odnosu na *F. verticillioides*, *F. oxysporum* i *B. dothidea*, zabilježene su nakon uzgoja *M. thermophila*, *P. variotii* i *T. terrestris*. Uzrok malih specifičnih aktivnosti mogli bi biti neadekvatni uvjeti uzgoja, posebice temperature koja je iznosila 30°C, dok ove plijesni imaju više optimalne temperature rasta (Herrera Bravo de Laguna i sur., 2015; Berka i sur., 2011; Margaritis i Merchant, 1986). Plijesan s ukupno najmanjom celololitičkom i hemicelulolitičkom specifičnom aktivnošću u odnosu na ostale sojeva, bio je *M. indicus*. Prema literaturi *M. indicus* ima sposobnost eksprimirati ekstracelularne enzime poput amilaza, celulaza, fitaza, i ksilanaza, koje mogu hidrolizirati lignocelulozne sirovine (Gulati i sur., 2007) što je djelomično i potvrđeno u ovom radu

Oksidoreduktaze poput fenol oksidaza (lakaza) ili hem peroksidaza (lignin peroksidaza (LiP), mangan peroksidaza (MnP) ili svestrana peroksidaza (VP) provode razgradnju lignina (Andlar i sur., 2018). Od svih ispitivanih plijesni određenu lakaznu aktivnost pokazali su *P. variotti*, *F. oxysporum*, *M. thermophila* i *B. dothidea*, dok je aktivnost LiP otkrivena u supernatantima *F. verticillioides* i *P. variotii*. Iako su ove plijesni pokazale određenu razinu lignin degradirajuće aktivnosti, vrijednost specifičnih aktivnosti bile su niže od 0,1 U mg⁻¹_{uk. proteina} što je u skladu s podacima iz literature za druge gljive mekog truljenja poput *Alternaria alternata*, *Penicillium chrysogenum*, *Botrytis cinerea* i *Fusarium* sp. (Janusz i sur., 2017; Bugg i sur., 2011).

Sveukupno, plijesni s najvećom lignocelulolitičkom aktivnošću bile su *F. oxysporum* f.sp. *langernariae* JCM 9293, koje su pokazale najveću aktivnost celulolitičkih enzima, i *Fusarium verticillioides* JCM 23107, koja je imala najveću aktivnost hemicelulaza. Kao najbolja podloga izdvojio se medij 4, koji sadrži CSL kao izvor dušika i PKO kao supstrat induktor. Sukladno tome, ovaj medij i ovi sojevi korišteni su u svim kasnijim eksperimentima proizvodnje i određivanja lignocelulolitičke aktivnosti.

5.1.3.1. Kombinirana redosljedna fermentacija čvrstog supstrata i submerzna fermentacija u svrhu proizvodnje lignocelulolitičkih enzima te njihova karakterizacija

Troškovi enzima za prevođenje sirovina u fermentibilne šećere glavni su čimbenik u ukupnim proizvodnim troškovima biogoriva ili biokemikalija. Prethodno obrađeni kukuruzni oklasci kompleksni su lignocelulozni materijal s visokim udjelom glukana i malim udjelom ksilana te su se kao takvi koristili kao induktor proizvodnje enzima u većem mjerilu metodom sekvencionalnog uzgoja u čvrstoj i submerznoj fazi odabranih sojeva plijesni (An i sur., 2016b). Enzimski kokteli proizvedeni ovom metodom učinkovitiji su u hidrolizi biljnih struktura, zbog sinergističkog učinka, gdje jedan enzim može djelovati na produkt drugog. Postupci koji koriste mješavine enzima također su učinkovitiji i ekološki prihvatljiviji u usporedbi s kemijskim procesima koji se koriste u razgradnji lignoceluloze, budući da je moguće prilagoditi vrste enzima i opterećenja kako bi se sirovina potpuno hidrolizirala. Mješavine enzima trebale bi biti dizajnirane tako da odgovaraju specifičnom supstratu, budući da svaki supstrat posjeduje jedinstvene karakteristike i zahtijeva odgovarajuće uvjete za svoju potpunu pretvorbu u jednostavne spojeve. Tijekom uzgoja *F. oxysporum f.sp. langernariae* JCM 9293 i *F. verticillioides* JCM 23107 svakodnevno je praćena aktivnost glukanaza i ksilanaza. Ujedno je proveden i uzgoj miješane kulture ove dvije plijesni. Uzgoj mješovite kulture u istom mediju proveden je radi istraživanja mogućnosti povećanja glukanazne i ksilanazne aktivnosti (Intasit i sur., 2021). Rezultati uzgoja prikazani su na Slici 26.

F. oxysporum i *F. verticillioides* rastle su u filamentoznom morfološkom obliku što je dovelo do povećanja viskoznosti podloge, no i dalje je bilo moguće održavati dobro miješanje i recirkulaciju medija (Y. Zhang i sur., 2017). Preliminarni uzgoji pokazali su da je proizvodnja glukanaza i ksilanaza potaknuta prisutnošću lignocelululozne sirovine, a maksimalne specifične aktivnosti tih enzima postignute su nekoliko dana nakon iscrpljenja dodane glukoze koja se utrošila nakon 24 h uzgoja. Tijekom uzgoja *F. verticillioides* maksimalna specifična egzoglukanazna aktivnost od $0,56 \text{ U mg}^{-1}_{\text{uk. proteina}}$ postignuta je nakon 5 dana uzgoja, dok je plijesan *F. oxysporum* postignula 6 puta veću egzoglukanaznu aktivnost ($3,33 \text{ U mg}^{-1}_{\text{uk. proteina}}$) nakon 7 dana uzgoja. Uzorci supernatanta uzgoja plijesni *F. oxysporum* pokazivali su i 2 puta veću endoglukanaznu aktivnost od $0,33 \text{ U mg}^{-1}_{\text{uk. proteina}}$ u usporedbi s $0,15 \text{ U mg}^{-1}_{\text{uk. proteina}}$ dobivenih s *F. verticillioides*, nakon 4 dana trajanja bioprocasa.

S obzirom da PKO sadrži određenu količinu nerazgrađene hemiceluloze, tijekom uzgoja praćena je i specifična ksilanazna aktivnost. Plijesan *F. verticillioides* nakon 7 dana uzgoja pokazuje ksilanaznu aktivnost od gotovo 16 U mg⁻¹_{uk. proteina}. Maksimalna specifična aktivnost ksilanaze tijekom uzgoja *F. oxysporum* postignuta je nakon 9 dana uzgoja i iznosila je 8,36 U mg⁻¹_{uk. proteina}, gotovo dva puta manja od one zabilježene kod uzgoja *F. verticillioides*. Daljnim trajanjem procesa dolazi do polakog smanjenja ksilanazne aktivnosti u oba uzgoja. Za ovu vrstu istraživanja, kvalitativno i kvantitativno uspoređivanje podataka je izazovno jer različiti istraživači prikazuju rezultate enzimskih aktivnosti na različite načine (Matrawy i sur., 2021; Bentil i sur., 2018; Elegbede i Lateef, 2018; da Silva Menezes i sur., 2017; Knob i sur., 2014; Ravalason i sur., 2012; Arabi i sur., 2011; S. Q. Yang i sur., 2006; OGel i sur., 2001; Saha, 2001).

F. oxysporum i *F. verticillioides* pokazale su različite specifične aktivnosti glukanaze i ksilanaze tijekom preliminarnih uzgoja, te je stoga bilo zanimljivo istražiti može li se ukupna endoglukanazna, egzoglukanazna i ksilanazna aktivnost povećati simultanim uzgojem ove dvije plijesni. Inokulum u ovom istraživanju bila je 10% (vol vol⁻¹; 5% svake plijesni) suspenzija predkultura *F. oxysporum* i *F. verticillioides*. U miješanom uzgoju ovih dviju plijesni, maksimalna specifična egzoglukanazna aktivnost postignuta je nakon 4 dana uzgoja i iznosila je 3,35 U mg⁻¹_{uk. proteina}. Plijesan *F. oxysporum* je u istom vremenskom periodu postigla otprilike 20% manju aktivnost od 2,66 U mg⁻¹_{uk. proteina}, a *F. verticillioides* samo 0,42 U mg⁻¹_{uk. proteina}, što je skoro 90% manja specifična aktivnost. Aktivnost endoglukanaze u miješanoj kulturi bila je gotovo ista kao i tijekom uzgoja *F. oxysporum* (0,35 U mg⁻¹_{uk. proteina}) i gotovo dva puta veća nego u usporedbi s uzgojem *F. verticillioides*. Specifična aktivnost ksilanaze dostignula je maksimum nakon 4 dana uzgoja miješane kulture i iznosila je 7,84 U mg⁻¹_{uk. proteina}. Istodobno su plijesni *F. verticillioides* i *F. oxysporum* pokazale specifične aktivnosti ksilanaze od 6,69 U mg⁻¹_{uk. proteina}, odnosno 2,86 U mg⁻¹_{uk. proteina}. Rezultati uzgoja miješane kulture pokazuju kako ne dolazi do značajnog povećanja glukanazne i ksilanazne aktivnosti. Vjerojatni razlog može biti antagonistička mikrobna interakcija te dvije odabrane plijesni kao što je to navedeno literaturi (Meena i sur., 2017; Köhl i sur., 2015; Palumbo i sur., 2008).

Kao što je prikazano na Slici 26., maksimalna aktivnost glukanaze i ksilanaze postignuta je nakon otprilike 6 dana uzgoja. Kako bi se dobio supernatant s maksimalnom mogućom aktivnošću za daljnje analize, uzgoji su ponovljeni. Nepročišćeni ekstrakt dobiven nakon centrifugiranja je koncentriran korištenjem modula za dijafiltraciju s membranom

veliĉine pora manjom od 10 kDa. Ovom metodom ekstrakt je djelomiĉno proĉišćen i koncentriran otprilike 7,5 do 8 puta. Aktivnosti enzima te volumeni ekstrakta sirovog i djelomiĉno proĉišćenog ekstrakta prikazani su u Tablici 14.

Rezultati pokazuju da je došlo do povećanja specifiĉne enzimске aktivnosti nakon postupka koncentriranja i djelomiĉnog proĉišćavanja. ZabiljeŹeno je dvostruko povećanje aktivnosti škrob reducirajućih enzima, te aktivnosti arabinaza, endoglukanaza i ksilanaza za obje korištene vrste iz roda *Fusarium*. Mananazna i egzoglukanazna aktivnost pokazuju 2,5 do 3 puta veću aktivnost nakon dijafiltracije. Relativno visoke aktivnosti ksilanaze i pektinaze važne su za enzimsku hidrolizu sirovina s visokim sadržajem ksilana i pektina bogatih arabinozom (Andlar i sur., 2018). Sirovi ekstrakt i djelomiĉno proĉišćeni ekstrakt korišteni su za SDS-PAGE kako bi se dobio profil proteina s obzirom na molekulsku masu (Slika 27.). Odabrane trake su zatim izrezane iz gela i pripremljene za LC-ESI-MS analizu. Neki od identificiranih enzima, prisutni u razliĉitim koncentracijama ovisno o organizmu koji ga proizvodi su: celulaza (E.C. 3.2.1.4), endo-1,3(4)- β -glukanaza (E.C. 3.2.1.6), β -glikozidaza (E.C. 3.2.1.21;), liheninaza (E.C. 3.2.1.73), α -galaktozidaza (E.C. 3.2.1.22), glukan 1,4- α -glukozidaza (E.C. 3.2.1.3), endo-1,4- β -ksilanaza (E.C. 3.2.1.8), β -1,3-glukanoziltransferaza (E.C. 2.4.1), α -N-arabinofuranozidaza (E.C. 3.2.1.55;), endopoligalakturonaza (E.C. 3.2.1.15), ksiloglukanaza (E.C. 3.2.1.151), karboksil ester hidrolaza (E.C. 3.1.1.1), katalaza-peroksidaza (E.C. 1.11.1.21), i nekoliko neokarakteriziranih enzima.

5.2. Uzgoj odabranih vrsta mikroorganizama (kvasca *Saccharomyces cerevisiae* Y9, plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 i bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781) zbog optimizacije procesa proizvodnje biogoriva i biokemikalija

5.2.1. Rezultati uzgoja kvasca *S. cerevisiae* Y9 i plijesni *M. indicus* DSM 2185 zbog optimizacije procesa proizvodnje biogoriva i biokemikalija

Kako bi se odredili određeni kinetički i bioprocenjski parametri (Slika 28-29, Tablica 15) dva moguća radna mikroorganizma za proizvodnju biogoriva i biokemikalija, *S. cerevisiae* Y9 i *M. indicus* DSM 2185, provedena je serija preliminarnih istraživanja u kojima se radni mikroorganizam uzgajao u kompleksnim hranjivim podlogama koje su sadržavale šećere podrijetlom iz predobrađenih lignoceluloznih sirovina točnije glukozu, ksilozu ili kombinaciju ta dva šećera kao izvore ugljika (Poglavlje 3.2.4.1.).

Kad su oba radna mikroorganizma uzgajana samo na glukozu kao izvoru ugljika u aerobnim uvjetima, utrošena je sva glukoza, no u različitim vremenskim intervalima i s različitim brzinama potrošnje glukoze. Primjerice, *S. cerevisiae* utrošio je svu glukozu nakon 7 h uzgoja s brzinom potrošnje $0,47 \text{ h}^{-1}$, dok je *M. indicus* iskoristio svu glukozu nakon 12 h, brzinom potrošnje $0,25 \text{ h}^{-1}$. Tijekom uzgoja *Saccharomyces cerevisiae* Y9 i *Mucor indicus* u anaerobnim uvjetima na podlozi koja je sadržavala glukozu, dolazi do pada brzina potrošnje glukoze za oba mikroorganizma. Tako je kvasac *S. cerevisiae* utrošio svu glukozu iz podloge nakon 22 h, dok je plijesni *M. indicus* trebalo više od 24 h za potpunu asimilaciju glukoze. Brzine potrošnje glukoze za oba mikroorganizma iznosile su $0,10 \text{ h}^{-1}$. Također je vidljiva i razlika u koeficijentima konverzije glukoze u etanol, *S. cerevisiae* je u aerobnim uvjetima postignuo vrijednost $0,19 \text{ g g}^{-1}$ što odgovara 37% od maksimalnog mogućeg koeficijenta konverzije ($Y_{\text{EtOH/S,teoretski}} = 0,51 \text{ g g}^{-1}$; Kang i sur., 2014; Okamoto i sur., 2014), dok je za *M. indicus* ta vrijednost iznosila 82,35% maksimalne teoretske, $0,42 \text{ g g}^{-1}$. Shodno tome, plijesan *M. indicus* je postignula i veću produktivnost dobivanja etanola na kraju procesa od $0,42 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, što je 2,63 puta više od produktivnosti kvasca *S. cerevisiae*, no maksimalne moguće produktivnosti, $1,18 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ i $0,50 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ u oba slučaja bile bi postignute skraćivanjem trajanja uzgoja na 12 h za *M. indicus*, odnosno 7 h za *S. cerevisiae*. U anaerobnim uvjetima oba mikroorganizma su proizvela veće koncentracije etanola pa je shodno tome kvasac postignuo

koeficijenti konverzije $0,44 \text{ g g}^{-1}$, a plijesan $0,46 \text{ g g}^{-1}$. Zbog duljeg trajanja procesa uzgoja ukupna produktivnost dobivanja etanola u bioprocesu uzgoja *M. indicus* ($P_{\text{retoh uk.}}=0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), niža je u usporedbi s produktivnošću kvasca ($P_{\text{retoh uk.}}=0,38 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Oba mikroorganizma, kao jedan od nusprodukata u aerobnim i anaerobnim uvjetima, proizvode glicerol u rasponu koncentracija od $0,12 \text{ g L}^{-1}$ do $1,16 \text{ g L}^{-1}$.

Kad je ksiloza bila jedini izvor ugljika u aerobnim i anaerobnim uvjetima, kvasac *S. cerevisiae* nije rastao niti proizvodio etanol. Ova pojava je posljedica činjenice da *S. cerevisiae* ne može metabolizirati ksilozu (Marđetko i sur., 2018). *M. indicus* je u aerobnim uvjetima postignuo brzinu potrošnje ksiloze jednaku brzini potrošnje glukoze od $0,25 \text{ h}^{-1}$, dok je u anaerobnim uvjetima iznosila $0,01 \text{ h}^{-1}$. Važno je napomenuti da je u aerobnim uvjetima potrošio svu glukozu nakon 48 h uzgoja, dok je u anaerobnim uvjetima nakon 72 h potrošio samo $4,42 \text{ g L}^{-1}$ glukoze (Slika 29.). U oba uzgoja, plijesan je osim etanola proizvela i glicerol te ksilitol. Koeficijent konverzije ksiloze u etanol u aerobnim uvjetima bio je $0,18 \text{ g g}^{-1}$, a u anaerobnim uvjetima iznosio je $0,11 \text{ g g}^{-1}$, što je dvostruko manje od vrijednosti dobivenih za uzgoje provedene na glukozu kao jedinom izvoru ugljika. Ukupne produktivnosti za oba spoja bile su iste, te su u aerobnim uvjetima dobivene vrijednosti $0,07 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a u anaerobnim $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Uzgoj kvasca u podlozi s glukozom i ksilozom okarakteriziran je sa nešto dužom lag fazom ($t_{\text{lag}}=3 \text{ h}$ u aerobnim i anaerobnim uvjetima, Slika 28.) u usporedbi s uzgojem samo na glukozu ($t_{\text{lag}}=2 \text{ h}$ u aerobnim i anaerobnim uvjetima), dok je plijesan u aerobnim uvjetima imala nešto kraću lag fazu ($t_{\text{lag}}=2 \text{ h}$) u usporedbi s uzgojima na glukozu i ksilozi gdje je $t_{\text{lag}}=3 \text{ h}$. *S. cerevisiae* je u aerobnim uvjetima potrošio svu glukozu nakon 9 h, te je u istom vremenu trošio i ksilozu no nakon toga potrošnja ksiloze se zaustavlja, te se utrošilo samo 35,3% ksiloze. Brzina potrošnje glukoze ($r_{\text{glc}}=0,48 \text{ h}^{-1}$) u ovom mediju gotovo je jednaka brzini potrošnje glukoze na podlogama s glukozom kao jedinim izvorom ugljika ($r_{\text{glc}}=0,47 \text{ h}^{-1}$), no u anaerobnim uvjetima brzina potrošnje glukoze pada na $0,05 \text{ h}^{-1}$. Plijesan *M. indicus* je u istim uvjetima svu glukozu iskoristila nakon 15 h u aerobnim, odnosno 48 h u anaerobnim uvjetima te je postigla nešto veću brzinu potrošnje glukoze od $0,53 \text{ h}^{-1}$ u aerobnim uvjetima u usporedbi sa *S. cerevisiae*, dok u anaerobnim uvjetima postiže manju vrijednost brzine potrošnje ($r_{\text{glc}}=0,03 \text{ h}^{-1}$). U usporedbi s kvascem, *M. indicus* počinje trošiti ksilozu tek nakon što je iz podloge iscrpljena sva glukoza (Slika 29.), što potvrđuje diauksijski rast (Karimi i Zamani, 2013). U aerobnim uvjetima ksiloza nije detektirana u podlozi 35 h nakon što je utrošena sva

glukoza te je brzina potrošnje ksiloze iznosila $0,11 \text{ h}^{-1}$, dok u anaerobnim uvjetima dolazi do neznatnog smanjenja koncentracije ksiloze sa $11,35 \text{ g L}^{-1}$ na $10,20 \text{ g L}^{-1}$ čak i nakon 48 h od potrošnje glukoze iz podloge, što se podudara s literaturom (Karimi i Zamani, 2013).

Usporedbom izračunatih koeficijenta konverzije supstrata u etanol iz eksperimentalnih podataka, može se zaključiti da *S. cerevisiae* u aerobnim i anaerobnim uvjetima postiže nešto manje vrijednosti koeficijenata ($Y_{\text{etoh/s}}=0,20 \text{ g g}^{-1}$ aerobno, $Y_{\text{etoh/s}}=0,36 \text{ g g}^{-1}$ anaerobno) u usporedbi s *M. indicus* ($Y_{\text{etoh/s}}=0,38 \text{ g g}^{-1}$ aerobno, $Y_{\text{etoh/s}}=0,41 \text{ g g}^{-1}$ anaerobno). Ovi koeficijenti mogu se usporediti s rezultatima dobivenima u radu Lopes i sur. (2017). U njihovom istraživanju različiti genetički modificirani sojevi kvasca *S. cerevisiae* simultano su koristili glukozu i ksilozu, te su postigli koeficijente konverzije od $0,34 \text{ g g}^{-1}$ do $0,45 \text{ g g}^{-1}$. Iako je plijesan postigla veće koeficijente konverzije, zbog duljeg trajanja procesa produktivnost dobivanja etanola je nakon uzgoja plijesni manja od one dobivene s kvascem. Tako je u aerobnim uvjetima produktivnost plijesni iznosila $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ u usporedbi s $0,20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ kvasca, a u anaerobnim uvjetima produktivnosti su bile $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ za *M. indicus* i $0,36 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ za *S. cerevisiae*. Maksimalne produktivnosti procesa proizvodnje etanola mogle bi se postići skraćivanjem vremena trajanja procesa (Tablica 15.). Iz rezultata se također može vidjeti da je plijesan i u ovim uvjetima proizvela glicerol te ksilitol. Veća koncentracija ksilitola ($\gamma_{\text{xoh}}=3,16 \text{ g L}^{-1}$) je dobivena u aerobnim uvjetima, dok je u anaerobnim uvjetima proizvedeno samo $0,44 \text{ g L}^{-1}$ ksilitola. Brzina proizvodnje ksilitola je u aerobnim uvjetima iznosila $0,08 \text{ h}^{-1}$, a u anaerobnim uvjetima je bila $0,02 \text{ h}^{-1}$. Ove vrijednosti su manje od onih dobivenih kod uzgoja plijesni u podlozi s ksilozom kao jedinom izvoru ugljika ($r_{\text{ksi}}=0,09 \text{ h}^{-1}$ aerobno, $r_{\text{ksi}}=0,05 \text{ h}^{-1}$ anaerobno). Ukupne produktivnosti ksilitola su u oba uvjeta uzgoja bile jednake vrijednostima dobivenima nakon uzgoja u mediju s ksilozom ($Pr_{\text{xoh}}=0,07$ aerobno, $Pr_{\text{xoh}}=0,01$ anaerobno).

Plijesan *M. indicus* je u svim provedenim preliminarnim eksperimentima pokazala veće koeficijente konverzije supstrata u biomasu (Tablica 15.) u usporedbi s kvascem *S. cerevisiae*. Najmanji koeficijent konverzije supstrata u biomasu dobiven je kod uzgoja na ksilozi ($Y_{\text{x/s}}=0,01 \text{ g g}^{-1}$), dok je maksimalan koeficijent konverzije od $0,29 \text{ g g}^{-1}$ dobiven kod bioprocesa s mješavinom glukoze i ksiloze u podlozi. Koeficijenti konverzije supstrata u biomasu za kvasac su se kretali u rasponu od $0,09 \text{ g g}^{-1}$ do $0,22 \text{ g g}^{-1}$, uz napomenu da kvasac nije rastao u podlozi s ksilozom kao jedinom izvorom ugljika.

Kako je jedna od sirovina korištena u ovom radu i BKHKO koji sadržava značajnu količinu ksiloze i nešto glukoze te različite inhibitore, za daljnja istraživanja i prema rezultatima dobivenim preliminarnim istraživanjima, kao radni mikroorganizam odabrana je plijesan *Mucor indicus* DSM 2185. Ova plijesan može koristiti i glukozu i ksilozu kao izvore ugljika, može rasti uz prisustvo inhibitora, te neke i asimilirati, a osim etanola proizvodi i druge biokemikalije kao što su ksilitol, glicerol, hitin, hitozan i masne kiseline (Shafiei Alavijeh i sur., 2020; Sharifyazd i Karimi, 2017; Satari i sur., 2016; Karimi i Zamani, 2013; Sues i sur., 2005).

5.2.2. Optimizacija uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 na podlogama s različitim izvorima dušika te glukozom kao izvorom ugljika u aerobnim uvjetima

Uzgoj odabranog radnog mikroorganizma, plijesni *Mucor indicus* DSM 2185, proveden je u podlozi s glukozom i različitim izvorima dušika. Ispitan je utjecaj diamonijevog fosfata, diamonijevog sulfata, kukuruzne močevine (CSL), mesnog ekstrakta, peptona i kvašćevog ekstrakta na rast biomase plijesni *M. indicus* i proizvodnju biogoriva i biokemikalija (Tablica 16-19.) (Poglavlje 3.2.4.4.).

Rast plijesni *M. indicus* i proizvodnja etanola nisu zamijećeni u podlogama s amonijevim solima kao jedinim izvorima dušika (podaci nisu prikazani), te se može zaključiti kako ove soli u koncentracijama od 1 do 10 g L⁻¹ nisu dobar izvor dušika. Ovakvi rezultati nisu u skladu s dostupnom literaturom, naime, Sharifyazad i Karimi (2017) proveli su uzgoj *M. indicus* u podlozi s glukozom kao izvorom ugljika i amonijevim sulfatom kao jedinim izvorom dušika, ali su sadržavale i druge soli poput kalcijevog klorida, magnezijevog sulfata heptahidrata i kalij dihidrogen fosfata. Proizveden je etanol s koeficijentom konverzije glukoze u etanol od 0,2 do 0,4 g g⁻¹ već pri koncentraciji amonijevog sulfata 1 g L⁻¹. Iz ovog se može zaključiti da su plijesni za rast osim izvora dušika potrebne i ostale soli kao izvori fosfata i minerala te da one utječu na aktivnost stanica plijesni.

Kao izvor dušika i ostalih hranjivih tvari koristili su se i kompleksni izvori kao što su kukuruzna močevina (CSL), mesni ekstrakt, hidrolizat kazeina-pepton i kvašćev ekstrakt. S obzirom na ostale kompleksne izvore dušika, rast *M. indicus* u hranjivoj podlozi s CSL-om karakteriziran je s dužim vremenom prilagodbe ($t_{lag} = 3$ h). Pri najmanjim koncentracijama CSL-a od 1,2 g L⁻¹ i 4 g L⁻¹, plijesan za vrijeme trajanja procesa od 48 sati nije u potpunosti utrošila glukozu (Tablica 16). Koeficijenti konverzije glukoze u etanol kretali su se u rasponu od 0,29 g g⁻¹ do 0,38 g g⁻¹, dok su maksimalne produktivnosti bioprocesa dobivena pri uzgojima s 5 g L⁻¹ i 7 g L⁻¹ CSL ($Pr_{etoh\ uk.} = 0,15$ g L⁻¹ h⁻¹). Daljnje povećanje koncentracije CSL-a dovodi do smanjenja produktivnosti bioprocesa. Uz etanol, za vrijeme trajanja procesa jedan od proizvoda je i biomasa plijesni, čije koncentracije su varirale od 1,60 g L⁻¹, pri najmanjoj koncentraciji CSL-a, do 4,79 g L⁻¹ pri najvećoj koncentraciji izvora dušika (Tablica 16).

Uzgojem na 1 g L⁻¹, 2 g L⁻¹ i 4 g L⁻¹ mesnog ekstrakta kao izvora dušika, *M. indicus* nije asimilirao svu glukozu (Tablica 17). Maksimalan koeficijent konverzije glukoze u etanol ($Y_{etoh/s} = 0,35$ g g⁻¹) postignut je pri najvećoj koncentraciji mesnog ekstrakta, dok su pri ostalim

koncentracijama dobivene vrijednosti koeficijenta konverzije od $0,06 \text{ g g}^{-1}$ do $0,31 \text{ g g}^{-1}$. Korištenjem mesnog ekstrakta kao izvora dušika dobivene su slične produktivnosti proizvodnje etanola kao i kod uzgoja sa CSL-om. Produktivnosti su se kretale u rasponu od $0,001 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pri 1 g L^{-1} mesnog ekstrakta do $0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pri 10 g L^{-1} . Koncentracije dobivene biomase nakon uzgoja kretale su se u sličnom intervalu (od $2,39 \text{ g L}^{-1}$ do $4,77 \text{ g L}^{-1}$), kao i kod uzgoja s CSL-om.

Kinetički parametri rasta *M. indicus* dobiveni nakon uzgoja u hranjivim podlogama s glukozom i različitim koncentracijama peptona i kvašćevog ekstrakta (Tablica 18-19.), pokazuju odstupanje od vrijednosti dobivenih u prethodnim eksperimentima s CSL-om i mesnim ekstraktom. Kad plijesan koristi pepton kao jedini izvor dušika, za vrijeme trajanja procesa *M. indicus* nije potrošio svu glukozu iz podloge. Plijesan je u 48 h potrošila između $10,78 \text{ g L}^{-1}$ i $15,30 \text{ g L}^{-1}$ glukoze. Najmanja koncentracija glukoze na kraju procesa detektirana je u uzgoju na 10 g L^{-1} peptona te je iznosila $8,58 \text{ g L}^{-1}$. Uslijed malog utroška glukoze, plijesan nije proizvela značajne količine etanola, te su one višestruko manje u usporedbi s prethodnim eksperimentima. Koeficijenti konverzije glukoze u etanol i biomasu kretali su se između $0,05 \text{ g g}^{-1}$ i $0,07 \text{ g g}^{-1}$, odnosno $0,08 \text{ g g}^{-1}$ i $0,20 \text{ g g}^{-1}$. Produktivnosti proizvodnje etanola bile su uglavnom jednake za sve ispitane koncentracije peptona ($\text{Pr}_{\text{etoh uk.}}=0,01\text{-}0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; Tablica 18.). *M. indicus* u uzgojima na hranjivoj podlozi s kvašćevim ekstraktom kao izvorom dušika, ne utroši svu glukozu u procesima s 1 g L^{-1} , 2 g L^{-1} , 4 g L^{-1} i 5 g L^{-1} kvašćevog ekstrakta. U ovim eksperimentima su postignuti i najmanji koeficijenti konverzije glukoze u etanol ($\text{Y}_{\text{etoh/s}}=0,02\text{-}0,06 \text{ g g}^{-1}$) u usporedbi s ostalim uzgojima. Dobivene vrijednosti koeficijenta konverzije supstrata u biomasu usporedive su s vrijednostima dobivenima u uzgojima s peptonom kao jedinom izvoru dušika, te su se kretale u rasponu od $0,08$ do $0,16 \text{ g g}^{-1}$, no ove vrijednosti su značajno manje od vrijednosti dobivene u uzgojima s CSL-om i mesnim ekstraktom kao izvorima dušika. Uslijed manje proizvedene koncentracije etanola, produktivnosti bioprocesa su niske kod svih ispitanih koncentracija kvašćevog ekstrakta ($\text{Pr}_{\text{etoh uk.}}=0,001\text{-}0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; Tablica 19.). U radu Shafiei Alavijeh i sur. (2020) autori izvještavaju o boljim rezultatima uzgoja na definiranoj podlozi s glukozom te kvašćevim ekstraktom i amonijevim sulfatom kao izvorima dušika. Naime, dobiveni koeficijent konverzije od $0,46 \text{ g}$ etanola po gramu glukoze uz slične uvjete uzgoja veći je od maksimalno postignutog koeficijenta konverzije u ovom radu ($\text{Y}_{\text{etoh/s}}=0,38 \text{ g g}^{-1}$) s CSL-om kao izvorom dušika, te višestruko veći od maksimalno postignutog s kvašćevim ekstraktom ($\text{Y}_{\text{etoh/s}}=0,06 \text{ g g}^{-1}$) kao

jedinim izvorom dušika. Mogući razlog ovakve razlike je nedostatak pomoćnih tvari poput KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ te CaCl_2 koje su korištene u gore navedenom istraživanju.

Najveće efikasnosti procesa proizvodnje etanola na različitim izvorima dušika postignute su na 5 i 7 g L⁻¹ CSL-a ($E_{\text{etoh}}=69,17\%$; $E_{\text{etoh}}=73,61\%$), praćene sa 68,00% dobivenih nakon uzgoja plijesni na najvećoj koncentraciji mesnog ekstrakta kao izvora dušika. U usporedbi, efikasnosti proizvodnje etanola na peptonu i kvašćevom ekstraktu, manje su oko 5 do 6 puta (Tablica 18-19.). S obzirom na sve prethodne rezultate, kao najbolji izvor dušika za uzgoj plijesni *M. indicus* u hranjivim podlogama s glukozom pokazao se CSL i mesni ekstrakt.

5.2.3. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na preobrađenom hidrolizatu kukuruznih oklasaka i različitim izvorima dušika

Nakon što su provedeni uzgoji plijesni *M. indicus* DSM 2158 na podlogama s glukozom i različitim izvorima dušika, provedeni su uzgoji na BKHKO dobivenom predobradom kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru (180°C, 10 min, 0,5% m vol⁻¹ H₂SO₄) (Slika 30-33.) sa i bez dodanog izvora dušika (Poglavlje 3.2.4.5.). Kiselinski hidrolizat kukuruznih oklasaka sadržavao je 4,35 ± 1,1 g L⁻¹ glukana; 23,60 ± 1,34 g L⁻¹ ksilana; 1,45 ± 0,68 g L⁻¹ arabinana; 3,82 ± 1,39 g L⁻¹ octene i 1,48 ± 0,42 g L⁻¹ mravlje kiseline, 0,97 ± 0,12 g L⁻¹ furana i 1,45 ± 0,23% (m vol⁻¹) lignina topljivog u kiselini. Uzimajući u obzir rezultate tih prethodnih eksperimenata uzgoja, kao izvor dušika u ovom slijedu uzgoja, korišteni su CSL i kvašćev ekstrakt. Mesni ekstrakt nije korišten zbog svoje visoke cijene, koja bi negativno utjecala na troškove proizvodnje (de la Torre i sur., 2018).

Plijesan *M. indicus* kultivirana je i na BKHKO bez dodatka izvora dušika (Slika 30a). Nakon 24 h uzgoja, plijesan je iscrpila gotovu svu glukozu iz podloge, nakon čega počinje trošiti ksiloze. Na kraju procesa, u podlozi je ostalo 70,9% od početne koncentracije ksiloze ($\gamma_{ksi}=15,26$ g L⁻¹). U sastavu BKHKO nalazi se i octena kiselina, koju je plijesan asimilirala brzinom potrošnje octene od 0,008 h⁻¹ tijekom svih 48 h trajanja uzgoja. Brzina potrošnje glukoze iznosila je 0,145 h⁻¹, a brzina potrošnje ksiloze bila je 0,01 h⁻¹. Nakon 48 sati plijesan je proizvela 0,55 g L⁻¹ etanola, što daje koeficijent konverzije supstrata u etanol 0,055 g g⁻¹ (Tablica 9). Osim etanola proizvedena je i mala količina ksilitola ($\gamma_{xoh}=0,39$ g L⁻¹) i glicerola ($\gamma_{glic}=0,20$ g L⁻¹).

Dodatkom izvora dušika u BKHKO dolazi do skraćivanja lag faze rasta s 8 h na 6 ili 4 h ovisno o korištenom izvoru (Slika 30-31., Tablica 20.). U svim uzgojima plijesan je nakon što je utrošila glukozu, počela koristiti ksiloze kao izvor ugljika. Octena kiselina je u potpunosti potrošena unutar 24 do 48 h uzgojem na kvašćevom ekstraktu, a na 1 g L⁻¹ CSL-a nije u potpunosti utrošena, dok povećanje koncentracije CSL-a s 5 g L⁻¹ na 10 g L⁻¹ dovodi do potpune potrošnje octene nakon 35 h, odnosno 24 h (Slika 30-31.). Brzine potrošnje glukoze veće su na kvašćevom ekstraktu ($r_{glic}=0,090-0,165$ h⁻¹) u usporedbi s CSL-om ($r_{glic}=0,050-0,072$ h⁻¹), dok su brzine potrošnje ksiloze donekle jednake ($r_{ksi}=0,014-0,063$ h⁻¹). Kao što je slučaj kod uzgoja ove plijesni na kemijski definiranim podlogama s glukozom i određenim izvorom dušika, povećanje koncentracije CSL-a ili kvašćevog ekstrakta rezultiralo je većim prinosom biomase i etanola, a samim time i većim produktivnostima proizvodnje etanola. Prinosi biomase u ovim

procesima bili su 1,2 do 1,4 puta veći od bioprocesa provedenog na BKHKO. Koeficijenti konverzije supstrata u biomasu u uzgojima s kvašćevim ekstraktom kretali su se u rasponu od $0,025 \text{ g g}^{-1}$ do $0,084 \text{ g g}^{-1}$, dok su više vrijednosti dobivene korištenjem CSL-a ($Y_{\text{etoh/s}}=0,029\text{--}0,232 \text{ g g}^{-1}$). Maksimalna produktivnost procesa proizvodnje etanola od $0,122 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ postignuta je upotrebom 10 g L^{-1} CSL-a. (Tablica 20).

Uzgoji sa i bez dodatnog izvora dušika (kvašćev ekstrakt i CSL) provedeni su i na BKHKO, koji je prethodno bio tretiran aktivnim ugljenom (DBKHKO). Djelovanjem aktivnog ugljena iz hidrolizata su uklonjeni inhibitori bioprocesa, poput octene i mravlje kiseline te dio prisutnih furana. Uklanjanje inhibitora bioprocesa tijekom uzgoja bez dodatnog izvora dušika, rezultiralo je skraćivanjem lag faze rasta plijesni, s 8 h na 6 h (Slika 32-33, Tablica 20.). Plijesan je svu glukozu iz DBKHKO potrošila dvostruko brže nego kad je rasla na BKHKO. Shodno tome, brzina potrošnje glukoze je veća, te iznosi $0,208 \text{ h}^{-1}$. *M. indicus* je u ovim uvjetima potrošio i više ksiloze, te je na kraju procesa u podlozi ostalo 56,6% ksiloze ($\gamma_{\text{ksi}}=12,46 \text{ g L}^{-1}$), što daje brzinu potrošnje ksiloze od $0,015 \text{ h}^{-1}$ u usporedbi s $0,01 \text{ h}^{-1}$ u uzgoju na BKHKO bez prisustva izvora dušika. Na kraju procesa u podlozi je detektirano $0,71 \text{ g L}^{-1}$ etanola. Zbog više potrošenih ugljikohidrata koeficijent konverzije supstrata u etanol je nešto manji ($Y_{\text{etoh/s}}=0,047 \text{ g g}^{-1}$), no ukupna produktivnost procesa je veća ($Pr_{\text{etoh}}=0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Tablica 20). Uz etanol proizvedena je i veća koncentracija biomase ($\gamma_{\text{x}}=3,178 \text{ g L}^{-1}$), glicerola ($\gamma_{\text{glic}}=3,178 \text{ g L}^{-1}$) i ksilitola ($\gamma_{\text{xoh}}=3,178 \text{ g L}^{-1}$).

Dodatak izvora dušika u DBKHKO dovodi do smanjenja lag faze za čak 200% (s 6 h na 2 h) te dolazi do povećanja brzine potrošnje glukoze, te se one uz dodatak kvašćevog ekstrakta kreću u rasponu od $0,129 \text{ h}^{-1}$ do $0,514 \text{ h}^{-1}$, dok uzgoji s CSL-om rezultiraju sa sličnim vrijednostima od $0,183 \text{ h}^{-1}$ do $0,424 \text{ h}^{-1}$. Nakon potpune potrošnje glukoze, plijesan troši ksilozu neznatno većim brzinama u usporedbi s uzgojima u BKHKO ($r_{\text{ksi}}=0,029 \text{ h}^{-1}\text{--}0,095 \text{ h}^{-1}$ za kvašćev ekstrakt; $r_{\text{ksi}}=0,022 \text{ h}^{-1}\text{--}0,089 \text{ h}^{-1}$ za CSL). Koeficijenti konverzije supstrata u etanol variraju ovisno o korištenom izvoru dušika. Veće vrijednosti dobivene su korištenjem CSL-a. Najveći koeficijent konverzije od $0,161 \text{ g g}^{-1}$ dobiven je pri 5 g L^{-1} CSL-a, a pri 1 g L^{-1} i 10 g L^{-1} iznosio je $0,062 \text{ g g}^{-1}$ odnosno $0,155 \text{ g g}^{-1}$. Ove vrijednosti su nešto manje u usporedbi sa uzgojima na BKHKO uz dodatak CSL-a. Korištenjem kvašćevog ekstrakta dobiveni su neznatno veći koeficijenti konverzije u usporedbi s uzgojem na BKHKO. Na 1 g L^{-1} dodanog izvora dušika iznosio je $0,109 \text{ g g}^{-1}$, na 5 g L^{-1} bio je $0,102 \text{ g g}^{-1}$, a na 10 g L^{-1} dobiveno je $0,074 \text{ g g}^{-1}$ (Tablica 20). Maksimalne produktivnosti proizvodnje etanola postignute su uz

dodatak 5 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta i CSL-a ($Pr_{etoh}=0,046$ g L⁻¹ h⁻¹ i 0,084 g L⁻¹ h⁻¹), što je manje u usporedbi s produktivnošću dobivenom nakon uzgoja *M. indicus* u BKHKO uz dodatak 10 g L⁻¹ CSL-a. Razlog ovog fenomena je to što u nekim uzgojima plijesan nakon što je potrošila svu glukozu i ksilozu iz podloge, počinje trošiti etanol (Slika 32-33.), a što je u skladu s literaturom (Karimi i Zamani, 2013). Skraćivanjem vremena trajanja procesa dobile bi se i veće produktivnosti bioprocesa. S obzirom na uzgoje u BKHKO, plijesan je u ovim uzgojima proizvela veće koncentracije biomase od 3,178 g L⁻¹ do 6,768 g L⁻¹. Ujedno su u ovim uzgojima dobiveni i veći prinosi ksilitola i glicerola, no zabilježeno je i da plijesan u nekim slučajevima počinje trošiti ksilitol nakon što je potrošila dostupnu glukozu i ksilozu (Slika 32-33.).

Usporedbom ovih rezultata s rezultatima iz rada Shafiei Alavijeh i sur. (2020) mogu se napraviti određene usporedbe. U tom radu postignut je koeficijent konverzije od 0,38 g g⁻¹, no kao sirovina korištena je kiselinski i enzimski predobrađena kukuruzovina drugačijeg sastava od korištene u gore navedenim eksperimentima. Naime, hidrolizat kukuruzovine je na početku uzgoja sadržavao 49,5 g L⁻¹ glukoze. Postoji i određena razlika s obzirom na uvjete uzgoja, s obzirom da su Shafiei Alavijeh i sur. (2020) bioproces proveli u anaerobnim uvjetima, dok su prethodno navedeni uzgoji provedeni u aerobnim uvjetima. Jedan od mogućih razloga razlike u prinosu etanola može biti i taj što je u aerobnim uvjetima, kisik zadnji akceptor elektrona u metabolizmu šećera, što znači da stanice plijesni proizvode manje etanola, a više se izvora ugljika troši na izgradnju staničnih sastojaka. U literaturi postoji još primjera proizvodnje etanola s pomoću plijesni *Mucor indicus* na hidrolizatima lignoceluloznih sirovina. Satari i suradnici (2016) su u aerobnim uvjetima uspješno proizveli etanol na hidrolizatu rižine slame, brjestovine i borovine s koeficijentima konverzije od 0,37 g g⁻¹, 0,33 g g⁻¹ i 0,25 g g⁻¹. Lennartsson i suradnici (2012) proveli su uzgoj *Mucor indicus* na hidrolizatu narančinih kora. Plijesan je u aerobnim uvjetima u Erlenmeyerovim tikvicama proizvela 0,41 g etanola po g heksoza i 57 mg g⁻¹ biomase odnosno u bioreaktoru 0,40 g g⁻¹ etanola i 0,75 mg g⁻¹ biomase. Uzgoje na hidrolizatima šumskog drvnog otpada koji su velikim dijelom činili otpaci smreke, radili su i Sues i sur. (2005). Oni su proizveli 0,42 g etanola po gramu asimiliranog šećera iz hranjive podloge.

5.2.3.1. Utjecaj izvora dušika na profil masnih kiselina u biomasi plijesni *M. indicus* DSM 2185 uzgajane na glukozi i različitim izvorima dušika

Mnogi eukariotski mikroorganizmi pohranjuju energiju u stanicama uglavnom u obliku triacilglicerola, a lipidi su sastavni dio membrana u obliku fosfolipida. *M. indicus* sintetizira masne kiseline koristeći acetyl-CoA, a dihidroksiaceton fosfat koristi za sintezu triacil glicerola i fosfolipida (Karimi i Zamani, 2013). Nakon provedenih uzgoja plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na hranjivim podlogama s različitim izvorima dušika, biomasa plijesni je centrifugiranjem izdvojena iz hranjivih podloga, osušena u sušioniku do konstantne mase te korištena u postupku ekstrakcije i analize sastava masnih kiselina.

Analizom sastava metilnih estera masnih kiselina (FAME) dobivenih nakon transesterifikacije i ekstrakcije iz uzoraka biomase plijesni, detektirane su 23 različite masne kiseline prisutne u varijabilnim koncentracijama. Detektirane masne kiseline su: heksanska kiselina (C6:0), oktanska kiselina (C8:0), dekanska kiselina (C10:0), undekanska kiselina (C11:0), dodekanska kiselina (C12:0), miristinska kiselina (C14:0), pentadekanska kiselina (C15:0), palmitinska kiselina (C16:0), palmitoleinska kiselina (C16:1 cis 9), margarinska kiselina (C17:0), heptadekanoična kiselina (C17:1 cis 10), stearinska kiselina (C18:0), oleinska kiselina (C18:1 cis 9), linoelaidna kiselina (C18:2 trans 9,12), linolna kiselina (C18:2 cis 9,12), γ -linolenska kiselina (C18:3 cis 6,9,12), α -linolenska kiselina (C18:3 cis 9,12,15), arahidinska kiselina (C20:0), eikozatrenska kiselina (C20:3 cis 11,14,17), eikozatetraenojska kiselina (C20:4 cis 5,8,11,14), eikozapentaenska kiselina (C20:5 cis 5,8,11,14,17), lignocerična kiselina (C24:0) i nervonska kiselina (C24:1 cis 15). Rezultati analize sastava biomase plijesni *M. indicus* prikazani su u Tablici 21-22. U biomasi plijesni dobivenoj nakon svih uzgoja najzastupljenije masne kiseline, detektirane u različitim koncentracijama, bile su palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1), linolna (C18:2), γ -linolenska kiselina (C18:3) i eikozatrenska kiselina (C20:3). Uspoređujući rezultate uzgoja provedenih na kemijski definiranim podlogama s glukozom, može se vidjeti da povećanjem koncentracije izvora dušika dolazi do pada ukupnog udjela masnih kiselina u biomasi plijesni, odnosno više masnih kiselina se nakuplja kad je plijesan limitirana izvorom dušika. Najviši udjeli postignuti su pri najmanjim koncentracijama od 1 i 2 g L⁻¹ izvora dušika. Ukupni udjeli za pojedine izvore dušika kretali su se u rasponu od 11,76% do 38,2% za pepton, 21,76% do 35,82% za kvasčev ekstrakt, 18,97% do 43,4% za CSL i od 0 do 31,1% za mesni ekstrakt (Tablica 21-22.). Uspoređujući ove rezultate može se vidjeti da su tijekom svih uzgoja proizvedene slične količine masnih kiselina s obzirom na udio masnih kiselina u biomasi plijesni.

5.2.3.2. Utjecaj različitih izvora dušika na profil masnih kiselina u biomasi plijesni *M. indicus* DSM 2185 uzgajane na SBKHKO i DBKHKO

Nakon uzgoja na kemijski definiranim podlogama s glukozom i dodanim izvorima dušika, provedeni su uzgoji na SBKHKO u DBKHKO bez dodatka izvora dušika i uz dodatak 1, 5 i 10 g L⁻¹ CSL-a odnosno kvašćevog ekstrakta.

Analizom uzoraka biomase detektirane su iste 23 masne kiseline kao i u uzgojima na kemijski definiranim podlogama s glukozom, no uz njih detektirane su još i gondoična kiselina (C20:1 cis 11), dokosaheksaenska kiselina (C22:6 cis 4,7,10,13,16,19) i trikozilna kiselina (C23:0). Najzastupljenija masna kiselina, detektirana u svim uzorcima biomase, bila je oleinska kiselina (C18:1 cis 9), koja je činila gotovo 50% svih masnih kiselina prisutnih u biomasi na kraju uzgoja. Osim nje, najzastupnjenije masne kiseline bile su palmitinska (C16:0), linoeloidna (C18:2 trans 9,12), linolna (C18:2 cis 9,12) i γ -linolenska kiselina (C18:3) (Tablica 23.).

Biomasa plijesni je nakon ovih uzgoja sadržavala više masnih kiselina u usporedbi s uzgojima na glukozu i uz dodatak izvora dušika. Ukupni udio masnih kiselina u biomasi dobivenoj nakon uzgoja na SBKHKO iznosio je 39,17% dok dodatak izvora dušika uzrokuje neznatan pad udjela masnih kiselina. Dodatkom kvašćevog ekstrakta udio masnih kiselina u biomasi kretao se od 23,51% pri najvećoj koncentraciji ekstrakta do 36,63% pri 1 g L⁻¹ kvašćevog ekstrakta, dok je nakon uzgoja sa 1 g L⁻¹, 5 g L⁻¹ i 10 g L⁻¹ CSL-a biomasa sadržavala 37,51%, 37,01% i 31,1% masnih kiselina. (Tablica 23.). Dekolorizacija BKHKO rezultira smanjenjem udjela masnih kiselina u biomasi plijesni za 1,295 puta u usporedbi s uzgojem na SBKHKO bez dodatka izvora dušika. Uzgojima na BBKHKO, uz dodatak kvašćevog ekstrakta dobiveni su manji udjeli masnih kiselina u biomasi u rasponu od 26,03% do 30,99%. Uzgoji provedeni s CSL-om pokazali su se nešto uspješnijima s obzirom na ukupnu masnu masnih kiselina, ali i udjele masnih kiselina u biomasi. Najveći udio masnih kiselina u ovom setu eksperimenata od 40,25% dobiven je nakon analize biomase kultivirane u DBKHKO uz dodatak 5 g L⁻¹ CSL-a. Proizvedeno je 1,55 g masnih kiselina, što je 18,3% više od 1,31 g masnih kiselina proizvedenih tijekom uzgoja na kemijski definiranoj podlozi s istom koncentracijom CSL-a. Shafiei Alavijeh i suradnici (2020) proveli su uzgoje na hidrolizatu kukuruzovine s kvašćevim ekstraktom i amonijevim sulfatom kao izvorima dušika. Plijesan *M. indicus* u ovim ekperimentima je proizvela $147,4 \pm 2$ mg lipida po gramu asimiliranog šećera iz podloge što je činilo 19,3% suhe tvari biomase plijesni. Ovi rezultati su otprilike dvostruko

manji u usporedbi s uzgojima na SBKHKO i DBKHKO bez i uz dodatak izvora dušika. Dok su u ovom radu nakon uzgoja, najzastupljenije masne kiseline u biomasi bile oleinska, linoelaidna i γ -linolenska kiselina, kao što je već napomenuto, u radu Shafiei Alavijeh i suradnici (2020) najviše je proizvedeno stearinske (53,5% od svih masnih kiselina) te palmitoleinske (22,7%) i palmitinske kiseline (13,7%). Utjecaj koncentracije izvora dušika na proizvodnju lipida odgovara podacima dostupnim u literaturi. Naime, Sharifyzad i Karimi (2017) navode kako niža koncentracija dušika, rezultira većim prinosom lipida. Jedna od strategija induciranja sinteze intracelularnih lipida je limitacija izvora dušika. Mikroorganizam u ovim uvjetima brzo asimilira sav dostupan dušik te nastavlja asimilirati dostupan izvor ugljika te ga nakuplja u stanicama u obliku lipida (Ratledge, 2004). U literaturi se može naći i utjecaj oblika rasta plijesni *M. indicus* na udio masnih kiselina. Naime, Satari i sur. (2016) zaključili su da kad plijesan raste u obliku pojedinačnih kolonija nakuplja više masnih kiselina nego kada raste u filamentoznom obliku.

5.2.4. Rezultati uzgoja bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 na TOHP dobivenom nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 na BKHKO

Ljubičasta nesumporna bakterija *R. adriaticum* DSM 2781 uzgajana je u mikroaerofilnim fototrofnim uvjetima na TOHP dobivenima nakon uzgoja plijesni *M. indicus* (Poglavlje 3.2.4.6.). Korištene hranjive podloge dobivene su nakon uzgoja na BKHKO sa i bez dodatka 5 g L⁻¹ CSL-a, te u kontrolnoj podlozi. TOHP BKHKO sadržavale su male koncentracije etanola, octene kiseline, glicerola i ksilitola. Nesumporne ljubičaste bakterije mogu rasti na alkoholima, organskim kiselinama i sličnim proizvodima metabolizma drugih mikroorganizama (Robert Tabita i sur., 1995). Iskorištavanjem TOHP, uzgojem bakterijske biomase i proizvodnjom vrijednih proizvoda ostvario bi se još veći stupanj iskorištenja lignocelulozne sirovine, te bi time i sama ekonomska isplativost biorafinerijskog sustava, za proizvodnju biogoriva i biokemikalija iz otpadnih lignoceluloznih sirovina bila veća.

Bakterija *R. adriaticum* uzgajana u kontrolnoj podlozi postignula je maksimalnu optičku gustoću nakon 4 dana uzgoja, nakon čega dolazi do pada koncentracije biomase (Slika 34a). Na kraju uzgoja, gravimetrijski određena koncentracija biomase bila je 0,66 g L⁻¹. Tijekom 7 dana praćena je i koncentracija ukupnih pigmenata pomoću spektrofotometrijskih metoda, koja je svakim danom uzgoja bila sve veća. Na kraju procesa iz biomase bakterije ekstrahirani su pigmenti i karotenoidi te je određena koncentracija bakterioklorofila *a*. Biomasa nesumpornih ljubičastih bakterija sadržavala je 3,70 mg g⁻¹ bakterioklorofila *a*.

Tijekom uzgoja na TOHP tijekom 7 dana, došlo je do malih promjena koncentracija prethodno prisutnih organskih spojeva, što ukazuje na mogućnost bakterije da metabolizira etanol, octenu kiselinu, ksilitol i glicerol. Uzgoj na TOHP BKHKO okarakteriziran je duljom lag fazom, koja je trajala 3 dana (Slika 34b). Bakterija je na TOHP BKHKO postigla oko 2 puta manju maksimalnu optičku gustoću u usporedbi s uzgojem na kontrolnoj podlozi i na TOHP BKHKO koji je prethodno sadržavao CSL. Ovo je vidljivo i na kraju uzgoja, nakon kojeg je dobiveno 0,37 g L⁻¹ bakterijske biomase, što je manje nego nakon uzgoja na kontrolnoj podlozi. Apsorbancija pigmenata prati rast optičke gustoće, te nakon 2. dana dolazi do većeg povećanja vrijednosti apsorbancije. Ekstrahiranjem pigmenata na kraju uzgoja, dobiveno je 17,52 mg bakterioklorofila *a* po g biomase bakterije, što je u usporedbi s kontrolom, povećanje od 7,74 puta. Uzgoj *R. adriaticum* na TOHP koja je prethodno sadržavala 5 g L⁻¹ CSL-a, pokazao se kao najbolji s obzirom na količinu proizvedene biomase bakterije (Slika 34c). Optička gustoća u ovom uzgoju konstantno raste, te poprima maksimalnu vrijednost 7. dana

uzgoja. Ovo je još više vidljivo na kraju uzgoja kada je gravimetrijskom metodom određena koncentracija bakterija od $0,798 \text{ g L}^{-1}$, što je za 215,68% veći prinos biomase u usporedbi s uzgojem provedenim na TOHP BKHKO. Ovaj uzgoj se ujedno pokazao i boljim što se tiče proizvodnje bakterioklorofila *a*. Nakon ekstrakcije, spektrofotometrijski je određena koncentracija koja je iznosila $60,12 \text{ mg g}^{-1}$. Ova vrijednost je u usporedbi s uzgojem na kontroli i TOHP BKHKO veća 16,25, odnosno 3,43 puta. Važno je istaknuti da je podloga nakon uzgoja na TOHP BKHKO s CSL-om sadržavala i $1,02 \text{ g L}^{-1}$ izopropanola koji može biti vrijedan proizvod uz pigmente ili samu biomasu bakterije. Naime, *R. adriaticum* može proizvoditi polihidroksibutirat kondenzacijom acetil-CoA u acetoacetyl-CoA i njegovom daljnjom polimerizacijom u uvjetima nedostatka dušika u hranjivoj podlozi. Moguće je da se centrifugiranjem iz podloge nisu uspjele izdvojiti sve stanice plijesni koje mogu biti dovoljan izvor dušika bakterijama *R. adriaticum*. Bakterije u takvim uvjetima umjesto polihidroksibutirata proizvode izopropanol. Naime, reakcijom transferaze od acetoacetyl-CoA nastaje acetoacetat koji se dekarboksilira u aceton i CO_2 . Djelovanjem alkohol-dehidrogenaze od nastalog acetona može nastati izopropanol. Ovaj put sinteze je samo pretpostavka, s obzirom da ova bakterija može asimilirati izopropanol kao izvor dušika (Alloul i sur., 2019; Sasikala i sur., 1997 Finn i sur., 1983).

U radu Novak i sur. (2020), autori izvještavaju o uzgojima i proizvodnji biomase i pigmenta bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 na podlogama s glukozom i ksilozom kao izvorima ugljika. Uzgojem ove bakterije na 3 g L^{-1} glukoze i ksiloze postignuta je produktivnost $0,017 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, s prinosom biomase na kraju procesa $1,507 \text{ g L}^{-1}$. Kako glukoza i ksiloza čine najveći dio ugljikohidrata u hidrolizatima lignoceluloznih sirovina (Mardetko i sur., 2018), ranije navedeni rezultati mogu se usporediti s uzgojem *R. adriaticum* iz ovog rada. Kao što je već napomenuto, najveća koncentracija biomase postignuta je na kraju uzgoja na TOHP BKHKO koja je prethodno sadržavao CSL, a iznosila je $0,798 \text{ g L}^{-1}$ s produktivnošću $0,0047 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Razlog manjih prinosa biomase u usporedbi s radom Novak i sur. (2020) mogu biti višestruko niže koncentracije glukoze i ksiloze preostale u TOHP BKHKO nakon uzgoja plijesni *M. indicus*, te nešto drugačiji uvjeti uzgoja.

5.2.5. Rezultati uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 dobiveni simultanom saharifikacijom i fermentacijom na PKO

Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 proveden je na čvrstom dijelu, zaostalom nakon kiselinske predobrade kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru, simultanom saharifikacijom i fermentacijom u aerobnim uvjetima u dva različita medija, puferu, i MHP, uz dodatak 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L.

Prilikom simultane saharifikacije i fermentacije plijesni *M. indicus* u MHP pri različitim temperaturama uz dodatak enzima praćena je promjena koncentracije glukoze, ksiloze, glicerola, ksilitola i etanola (Slika 35.). U svim provedenim eksperimentima vidljivo je da koncentracija glukoze i ksiloze rastu u prvih nekoliko sati trajanja procesa simultane saharifikacije i fermentacije. Tako pri 20°C koncentracija glukoze povećava prvih 12 h te se od početne koncentracije od 9,03 g L⁻¹ povećava do maksimalne vrijednosti 11,98 g L⁻¹, nakon čega se počinje smanjivati te je nakon provedenog procesa, u podlozi detektirano 7,32 g L⁻¹ glukoze. Ksiloza svoju maksimalnu vrijednost postiže nešto ranije, u 6 h trajanja procesa, te ona iznosi 10,72 g L⁻¹. Uspoređujući ove rezultate s rezultatima dobivenima nakon uzgoja pri 30°C i 40°C, vidljivo je da pri 30°C koncentracija glukoze postiže svoj maksimum nakon 4 h procesa, a pri 40°C nakon 12 h. Koncentracija glukoze u 4 h procesa pri 30°C iznosila je 11,07 g L⁻¹, dok je pri 40°C maksimalna koncentracija bila 2,08 puta veća ($\gamma_{glc}=22,98$ g L⁻¹). Pri ovim temperaturama maksimalne koncentracije ksiloze su postignute nakon 6 h ($\gamma_{ksi}=10,56$ g L⁻¹), odnosno 12 h ($\gamma_{ksi}=10,75$ g L⁻¹) (Slika 35.). Plijesan *M. indicus* je jedino kod uzgoja pri temperaturi od 30°C u 48 h potrošila svu glukozu i ksilozu iz podloge, dok su pri 20°C i 40°C na kraju bioprocesa u podlogama detektirane i glukoza i ksiloza u različitim koncentracijama (Slika 35.). Na kraju procesa maksimalni prinos etanola od 14,95 g L⁻¹ ostvaren je pri 30°C, dok je pri 40°C on bio 2,4 puta manji ($Y_{etoh}=6,26$ g L⁻¹), a pri 20°C plijesan je proizvela zanemarivu količinu etanola ($Y_{etoh}=0,31$ g L⁻¹). S obzirom na rezultate eksperimenata, za izračunavanje koeficijenata konverzije i produktivnosti procesa, kao koncentracija supstrata uzeta je maksimalna teoretski dostupna koncentracija glukoze i ksiloze dobivena 100% hidrolizom sirovine uvećane za početnu koncentraciju ovih ugljikohidrata ($\gamma_{glc\ max}=31,26$ g L⁻¹, $\gamma_{ksi\ max}=11,12$ g L⁻¹). Sukladno tome, najveći koeficijent konverzije supstrata u etanol i produktivnost procesa postignute su pri 30°C. Koeficijent konverzije supstrata u etanol pri ovoj je temperaturi iznosio 0,376 g g⁻¹, što je 73,73% od maksimalno teoretski mogućeg koeficijenta konverzije, a produktivnost proizvodnje etanola je bila 0,304 g L⁻¹ h⁻¹ (Tablica 24.). Pri 40°C i 20°C koeficijent konverzije supstrata u etanol iznosio je 0,206 g g⁻¹, odnosno 0,032 g g⁻¹.

Produktivnosti proizvodnje etanola na ovim temperaturama bile su značajno niže ($Pr_{etoh40}=0,093 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $Pr_{etoh30}=0,014 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) od one maksimalno postignute na 30°C . Osim etanola, plijesan je proizvela i malu količinu glicerola i ksilitola, te su maksimalni prinosi ovih kemikalija, a samim time i koeficijenti konverzije i produktivnosti, postignuti pri temperaturi procesa od 30°C (Tablica 24.).

Proces simultane saharifikacije i fermentacije proveden je i u acetatnom puferu pH vrijednosti od $\text{pH}=5,00$. Prilikom uzgoja praćene su koncentracije istih spojeva kao i u MHP (Slika 36.). Rezultati prikazuju da pri svim temperaturama dolazi do hidrolize sirovine, te porasta koncentracije glukoze i ksiloze različitim brzinama. U procesu vođenom na 20°C maksimalna koncentracija glukoze i ksiloze od $11,67 \text{ g L}^{-1}$ odnosno $11,22 \text{ g L}^{-1}$ postignute su nakon 12 h i 48 h. Povećanjem temperature, kao i u eksperimentima u MHP, postignute su veće maksimalne koncentracije ugljikohidrata u podlozi, odnosno povećava se uspješnost hidrolize PKO. Pri 30°C koncentracija glukoze raste prva 4 h, te dostiže vrijednost $14,65 \text{ g L}^{-1}$, što je u usporedbi s procesom u MHP povećanje koncentracije za 24,44%. No maksimalna postignuta koncentracija glukoze detektirana je u procesu vođenom pri 40°C . U ovim uvjetima, koncentracija glukoze se povećava 12 h ($\gamma_{glc}=25,16 \text{ g L}^{-1}$), nakon čega dolazi do njenog smanjenja (Slika 36.). Ova vrijednost je veća za 8,66% od one postignute pri istoj temperaturi procesa u MHP. Koncentracije ksiloze pri 30°C i 40°C također se povećavaju prvih nekoliko sati i dostižu vrijednosti $11,02 \text{ g L}^{-1}$ odnosno $12,99 \text{ g L}^{-1}$. S obzirom da su bioprocesi izvršeni u acetatnom puferu, plijesan pri svim temperaturama polako troši acetat iz podloge. Pri 20°C plijesan je utrošila $1,10 \text{ g L}^{-1}$ acetata, pri 30°C potrošena je dvostruko veća količina acetata od $2,18 \text{ g L}^{-1}$, a pri 40°C *M. indicus* asimilirala je $1,47 \text{ g L}^{-1}$ acetata (Slika 36.). Plijesan *M. indicus* pri svim temperaturama proizvodi etanol i glicerol, dok je ksilitol detektiran samo tijekom bioprocesa vođenog pri temperaturi 30°C ($Y_{ksi}=0,89 \text{ g L}^{-1}$), no prinos ksilitola je manji u usporedbi s maksimalno postignutim prinosom pri istoj temperaturi u MHP kao podlozi ($Y_{ksi}=1,95 \text{ g L}^{-1}$). Prinosi etanola razlikovali su se ovisno o temperaturi bioprocesa. Tako je pri 20°C proizvedeno $0,68 \text{ g L}^{-1}$ etanola, pri 30°C plijesan je proizvela $14,61 \text{ g L}^{-1}$, a pri 40°C dobiveno je $4,46 \text{ g L}^{-1}$ etanola. Sukladno ovome postignuti su i različiti koeficijenti konverzije supstrata u etanol od $0,032 \text{ g g}^{-1}$, $0,376 \text{ g g}^{-1}$ i $0,206 \text{ g g}^{-1}$ (Tablica 24.). Uspoređujući produktivnosti ovih bioprocesa s bioprocesima u MHP, vidi se da su one otprilike iste, uz neka neznatna odstupanja. Najveća produktivnost od svih provedenih procesa proizvodnje etanola simultanom saharifikacijom i fermentacijom dobivena je pri 30°C u puferu ($Pr_{etoh}=0,312 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), praćena produktivnošću od $0,304 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ procesa u MHP također provedenog pri 30°C .

Dobiveni rezultati mogu se usporediti s rezultatima istraživanja Karimi i sur. (2006). Oni su proveli simultanu saharifikaciju i fermentaciju rižine slame dodatkom različitih koncentracija komercijalnih celulaza. Radni mikroorganizmi u ovom istraživanju bili su *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae* i *Saccharomyces cerevisiae*. Maksimalan koeficijent konverzije supstrata u etanol od 0,35 g g⁻¹ dobiven je nakon 7 dana uzgoja *R. oryzae* u anaerobnim uvjetima, dok je *M. indicus* u istom vremenskom razdoblju i pri istim uvjetima bioprocesa postignuo koeficijent konverzije 0,34 g L⁻¹. Ove vrijednosti neznatno su niže od maksimalno dobivenih koeficijenta konverzije prilikom simultane saharifikacije i fermentacije *M. indicus* u aerobnim uvjetima u acetatnom puferu ($Y_{\text{etoh/s}}=0,376 \text{ g L}^{-1}$), odnosno dobivenih u procesu provedenom u MHP ($Y_{\text{etoh/s}}=0,37 \text{ g L}^{-1}$).

Rezultati pokazuju da su temperature od 20°C i 40°C preniske odnosno previsoke za uzgoj *M. indicus*, pa su sukladno tome i produktivnosti proizvodnje etanola vođenih pri tim temperaturama niže od onih dobivenih pri 30°C. No za samu enzimsku hidrolizu sirovine najbolja je temperatura od 40°C, jer prema uputama proizvođača optimalna temperatura za enzimsku hidrolizu 50°C, dok povećanje i smanjenje temperature dovodi do pada aktivnosti enzima prisutnih u komercijalnim enzimskim pripravcima. Iz dobivenih rezultata zaključeno je da je za proces simultane saharifikacije i fermentacije optimalna temperatura od 30°C. Ova temperatura je optimalna za rast biomase i proizvodnju etanola i ostalih proizvoda. Ujedno se uvidjelo da je MHP najbolja podloga za uzgoj u većem mjerilu te da je za efikasnu enzimsku hidrolizu potreban dodatak 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L.

5.3. Rezultati optimizacije proizvodnje biogoriva i biokemikalija tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 provedeni u različitim tipovima bioreaktora

Nakon preliminarnih uzgoja, provedeni su uzgoji plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 u većem mjerilu korištenjem različitih tipova bioreaktora. S obzirom na dobivene rezultate u preliminarnim eksperimentima, kao hranjiva podloga korišteni su tekući dio dobiven nakon kiselinske hidrolize kukuruznih oklasaka u visokotlačnom reaktoru pri 180°C i vremenu zadržavanja od 10 min, te enzimski hidrolizat čvrstog dijela zaostalog nakon blago kisele predobrade dobiven korištenjem 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blenda i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L pri 50°C u MHP. U obje podloge je kao izvor dušika dodano 5 g L⁻¹ CSL-a. Uzgoji su provedeni u različitim bioreaktorskim sustavima kako bi se odredilo u kojim uvjetima aeracije, miješanja i temperature se postiže najveća efikasnost proizvodnje etanola i biomase plijesni.

5.3.1. Rezultati uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom

*5.3.1.1. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na BKHKO u bioreaktoru s miješalom*

Uzgoj u bioreaktoru s miješalom korisnog volumena 1,5 L proveden je na BKHKO u aerobnim uvjetima uz protok zraka 1 L h⁻¹, brzinom miješanja 50 o min⁻¹ i temperaturi procesa održavanoj na 30°C (Poglavlje 3.2.5.1.).

Tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* bilo je potrebno 48 h da se utroši sav dostupan izvor ugljika iz podloge (glukoza, ksiloza i octena kiselina). Nakon 12 h uzgoja, koncentracija glukoze je pala na 0 g L⁻¹ s početnih 5,45 g L⁻¹, te je u istom vremenu utrošeno 2,57 g L⁻¹ octene kiseline. Plijesan počinje trošiti ksilozu nakon što je potrošena sva glukoza, što znači da je glukoza preferirani izvor ugljika i energije za *M. indicus*. Nakon 36 h uzgoja, plijesan je potrošila i svu dostupnu ksilozu (21,5 g L⁻¹; Slika 37). Brzine potrošnje glukoze, ksiloze i octene kiseline u ovom bioprocesu iznosile su 0,245 h⁻¹, 0,113 h⁻¹ i 0,127 h⁻¹ (Tablica 25). Prinos etanola je u prvih 12 sati bio 2,56 g L⁻¹, što daje produktivnost od 0,21 g⁻¹ L⁻¹ h⁻¹. Nakon 12 h vidi se kontinuirani pad koncentracije ksiloze i rast koncentracije etanola, te je tako na kraju procesa u podlozi detektirano 6,88 g L⁻¹ etanola (Slika 37). Produktivnost tijekom ovog uzgoja plijesni na ksilozi kao izvoru ugljika ($P_{\text{etoh ksi.}} = 0,12 \text{ g}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) čini nešto manjom u usporedbi s rastom na glukozi. Koeficijent konverzije supstrata u etanol iznosio je 50%

teoretski maskimalno mogućeg ($Y_{\text{etoh/s}}=0,255 \text{ g}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Brzina proizvodnje etanola tijekom procesa iznosila je $0,269 \text{ h}^{-1}$, a ukupna produktivnost proizvodnje etanola iznosila je $0,143 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Osim etanola, plijesan je proizvela i glicerol i ksilitol. Glicerol je detektiran tek nakon 6 h uzgoja, a maksimalna koncentracija postignuta je na kraju procesa i iznosi $0,37 \text{ g L}^{-1}$ (Slika 37). Koncentracija ksilitola kontinuirano raste kako plijesan troši ksiloze (Slika 37) te dostiže svoju maksimalnu vrijednost na kraju procesa ($\gamma_{\text{xoh}}=8,07 \text{ g L}^{-1}$). Na kraju procesa, biomasa plijesni odvojena je od podloge centrifugiranjem i prebačena na sušenje te je gravimetrijski određena koncentracija. Izvagana su $6,50 \text{ g}$ suhe tvari biomase što je jednako koncentraciji biomase u podlozi na kraju procesa od $4,34 \text{ g L}^{-1}$. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu iznosio je $0,161 \text{ g g}^{-1}$.

5.3.1.2. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na E-PKO u bioreaktoru s miješalom

Uzgoj plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na E-PKO proveden je bioreaktoru korisnog volumena $1,5 \text{ L}$ pri istim uvjetima kao i bioproces u kojem je hranjiva podloga bio BKHKO (Poglavlje 3.2.5.1.).

Hranjiva podloga E-PKO je drugačijeg sastava ugljikohidrata u usporedbi s BKHKO. Podloga je na početku procesa sadržavala $19,85 \text{ g L}^{-1}$ glukoze, $3,94 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze i nešto arabinoze. Plijesan je kao i u svim dosadašnjim uzgojima, prvo potrošila svu glukozu, te je nakon 8 h vidljiv prijelaz potrošnje glukoze na ksiloze (Slika 38). Za potrošnju svih ugljikohidrata bilo je potrebno 30 h. Plijesan je svih $19,85 \text{ g L}^{-1}$ glukoze utrošila nakon 12 h, te je u tom vremenu proizvela i najviše etanola $7,55 \text{ g L}^{-1}$. Produktivnost procesa proizvodnje etanola u tom vremenskom razdoblju bila je $0,63 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Za potpunu asimilaciju ksiloze bilo je potrebno još dodatnih 18 h procesa, a proizvedeno je samo $0,91 \text{ g L}^{-1}$ etanola i $0,81 \text{ g L}^{-1}$ ksilitola. S obzirom da je proces nakon ovog trajao još dodatnih 18 h, plijesan je u tom vremenskom razdoblju trošila etanol i ksilitol iz podloge. Produktivnost cjelokupnog procesa proizvodnje etanola bila je $0,157 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, što je manje u usporedbi s uzgojem na BKHKO, no ako bi se bioproces zaustavio nakon 30 h, kad plijesan potroši sve ugljikohidrate iz podloge, produktivnost bi bila jednaka produktivnosti bioprocesa kao u prethodnom uzgoju (Poglavlje 5.3.1.1.; $Pr_{\text{etoh max}}=0,255 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Tablica 25-26). Brzina potrošnje glukoze tijekom bioprocesa bila je $0,249 \text{ h}^{-1}$, ksiloze $0,017 \text{ h}^{-1}$, dok je brzina proizvodnje etanola iznosila $0,220 \text{ h}^{-1}$. Potrebno je napomenuti da je osim etanola i ksilitola, plijesan proizvela i glicerol ($Y_{\text{glic/s}}=0,012 \text{ g L}^{-1}$) te biomasu u koncentraciji od $7,00 \text{ g L}^{-1}$ s koeficijentom konverzije

supstrata u biomasu $Y_{x/s}=0,294 \text{ g g}^{-1}$. Prethodno navedeno potvrđuje da sastav hranjive podloge pogoduje rastu biomase plijesni.

5.3.2. Rezultati uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u barbotirajućoj koloni

5.3.2.1. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na BKHKO u barbotirajućoj koloni

Tijekom uzgoja u barbotirajućoj koloni korisnog volumena 1,5 L kao podloga korišten je BKHKO. Uzgoji su provedeni pri temperaturi uzgoja od 30°C , uz povećanje aeracije na 2 L min^{-1} . Protok zraka služio je i za izmješavanje fermentacijske podloge tijekom uzgoja (Poglavlje 3.2.5.2.).

Početni sastav podloge za uzgoj plijesni *M. indicus* u barbotirajućoj koloni s ciljem proizvodnje biogoriva i biokemikalija, sadržavao je $3,46 \text{ g L}^{-1}$ glukoze i $20,5 \text{ g L}^{-1}$ ksiloze. (Slika 39.). Lag faza za ovaj uzgoj, trajala je sat vremena, nakon čega plijesan *M. indicus* počinje trošiti glukozu, koju se utroši nakon 10 h trajanja bioprocesa, što je brže u usporedbi s uzgojem u bioreaktoru s miješalom. Tijekom tog vremena produktivnost proizvodnje etanola bila je $0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. U istom vremenu plijesan je asimilirila gotovu svu octenu kiselinu iz podloge, te je se njena koncentracija smanjila na $1,36 \text{ g L}^{-1}$ s početnih $4,6 \text{ g L}^{-1}$. Do smanjenja koncentracije ksiloze dolazi nakon 10 h uzgoja, a svu ksilozu iz podloge plijesan je potrošila nakon 32 h trajanja uzgoja. Proizvodnja etanola se nastavlja sve do 32. h, te je u tom vremenskom periodu proizvedeno novih $4,27 \text{ g L}^{-1}$ etanola, no na kraju samog bioprocesa, koncentracija etanola smanjila se na $3,73 \text{ g L}^{-1}$. Plijesan je u zadnjim satima uzgoja počela trošiti etanol, s obzirom da je potrošila sve ostale izvore ugljika. Samim time je i produktivnost ovog dijela bioprocesa iznosila $0,06 \text{ g}^{-1} \text{ L}^{-1}$. Brzine potrošnje glukoze i ksiloze ($r_{\text{glc}}=0,260 \text{ h}^{-1}$; $r_{\text{ksi}}=0,085 \text{ h}^{-1}$) neznatno odstupaju od vrijednosti dobivenih tijekom bioprocesa u bioreaktoru s miješalom. U usporedbi s uzgojem u bioreaktoru s miješalom, proizvedena je manja količina ksilitola, maksimalna koncentracija od $2,05 \text{ g L}^{-1}$ zabilježena je u 32. h uzgoja, nakon čega dolazi do njenog pada, te je na kraju procesa detektirana koncentracija ksilitola u podlozi bila $0,59 \text{ g L}^{-1}$ (Slika 39.). Koeficijent konverzije supstrata u etanol za cijeli bioproces iznosi $0,157 \text{ g g}^{-1}$, što je 1,62 puta manje od bioprocesa provedenog u bioreaktoru s miješalom. (Tablica 25-26.), no skraćivanjem vremena uzgoja na 32 h kad se u podlozi nalazila maksimalna koncentracija etanola, dolazi do povećanja koeficijenta konverzije supstrata u etanol ($Y_{\text{etoh/s max}}=0,255 \text{ g g}^{-1}$) na istu vrijednost kao i kod bioreaktora s miješalom. Brzina proizvodnje etanola u ovom procesu iznosila je $0,06 \text{ h}^{-1}$.

5.3.2.2. Uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2185 na E-PKO u barbotirajućoj koloni

Uzgoj je u barbotirajućoj koloni proveden i korištenjem E-PKO kao hranjive podloge. Uvjeti uzgoja bili su jednaki kao i kod uzgoja na BKHKO u ovom istom reaktorskom sustavu (Poglavlje 3.2.5.2.).

Uzgoj na E-PKO u barbotirajućoj koloni trajao je samo 24 h. Plijesan *M. indicus* je u tom vremenu potrošila svu glukozu ($\gamma_{glc}=17,37 \text{ g L}^{-1}$) i ksilozu ($\gamma_{ksi}=4,49 \text{ g L}^{-1}$) koje su se nalazile u podlozi. Kao i u svim prijašnjim uzgojima, plijesan je najprije trošila glukozu, te ju je iscrpila nakon 12 h uzgoja. Tada je proizvela i maksimalnu koncentraciju etanola (Slika 40.). Prinos etanola je u 12 h trajanja bioprocasa iznosio $7,98 \text{ g L}^{-1}$, što rezultira s produktivnošću od $0,442 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tablica 25-26.). S obzirom na manju koncentraciju ksiloze prisutne u podlozi, plijesan ju je utrošila prije završetka bioprocasa, te je zbog iscrpljenja ovog izvora ugljika, počela trošiti proizvedeni etanol, čija je koncentracija uslijed toga pala za $1,49 \text{ g L}^{-1}$ (Slika 40.). Samim time produktivnost ukupnog procesa dobivanja etanola iznosila je $0,27 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Uspoređujući ovu vrijednost s vrijednošću dobivenom u bioreaktoru s miješalom, može se vidjeti da je ona dvostruko veća. Maksimalna produktivnost procesa proizvodnje etanola od $0,665 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mogla bi se dostići skraćivanjem vremena trajanja procesa na vrijeme koje je plijesni potrebno da utroši sve šećere iz podloge. Tijekom ovog bioprocasa postignuta je najveća koncentracija biomase plijesni u usporedbi s ostalim uzgojima u drugim bioreaktorskim sustavima, te je dobiveni koeficijent konverzije supstrata u biomasu plijesni od $0,369 \text{ g g}^{-1}$. Plijesan je u ovim uvjetima proizvela $0,66 \text{ g L}^{-1}$ glicerola, a uslijed veće aeracije nije proizvela ksilitol. Etanol je proizvođen brzinom od $0,288 \text{ h}^{-1}$, a brzine potrošnje ugljikohidrata iznosile su $0,489 \text{ h}^{-1}$ za glukozu, najveća zabilježena od svih bioreaktorskih sustava, i $0,021 \text{ h}^{-1}$ za ksilozu.

5.3.3. Rezultati uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u HRCB-u

5.3.3.1. Uzgoj plijesni *M. indicus* na BKHKO u HRCB-u

Uzgoj u HRCB-u proveden je kako bi se ispitalo da li se može postići efikasna proizvodnja etanola u ovom tipu bioreaktora. S obzirom na bioreaktor s miješalom i barbotirajuću kolonu, uzgoj je izvršen u mikroaerofilnim uvjetima, pri sobnoj temperaturi i frekvenciji rotacije od 20 o min⁻¹ (Poglavlje 3.2.5.3.).

S obzirom na prethodne tipove bioreaktora, proces proizvodnje biogoriva i biokemikalija je u HRCB-u trajao sveukupno 144 h. Plijesan je bila u fazi prilagodbe 2h, nakon čega počinje trošiti glukozu. Za potpunu konzumaciju svih 5,21 g L⁻¹ glukoze bilo joj je potrebno još dodatnih 10 h, brzinom potrošnje 0,167 h⁻¹. Glukoza nije detektirana u 24. h trajanja procesa, no plijesan ju je potrošila i prije ovog, jer je u 24. h zabilježen lagani pad koncentracije ksiloze. S obzirom na mikroaerofilne uvjeti, potrošnja ksiloze je tekla vrlo sporo (0,024 h⁻¹), te je za potpunu asimilaciju 23,1 g L⁻¹ ksiloze bilo potrebno 144 h (Slika 41.). Tijekom cijelog bioprocesa, zabilježen je i pad koncentracije octene kiseline, koju je plijesan potrošila nakon 120 h. Plijesan je u ovim uvjetima proizvela 4,16 g L⁻¹ etanola, što daje ukupnu produktivnost proizvodnje etanola od 0,029 g L⁻¹ h⁻¹, najmanja u usporedbi s ostalim tipovima bioreaktora. Zbog uvjeta limitacije kisikom, plijesan proizvodi i ksilitol, te je na kraju procesa detektirano 1,53 g L⁻¹ ksilitola. Uz etanol i ksilitol, proizvedeno je i 0,47 g L⁻¹ glicerola. Koeficijent konverzije supstrata u etanol iznosio je 0,149 g g⁻¹. Ova vrijednost je u usporedbi s uzgojima provedenim u ostala dva tipa bioreaktora znatno manja. Osim etanola, glicerola i ksilitola, plijesan je proizvela i određenu količinu biomase, te je koeficijent konverzije supstrata u biomasu bio 0,114 g g⁻¹ (Tablica 25-26.).

5.3.3.2. Uzgoj plijesni *M. indicus* u HRCB-u na E-PKO

Za uzgoj plijesni *M. indicus* na E-PKO korišteni su isti uvjeti kao i kod prethodnog uzgoja na BKHKO u ovom istom bioreaktorskom sustavu, pri sobnoj temperaturi i frekvenciji rotacije od 20 o min⁻¹ (Poglavlje 3.2.5.3.).

Proces proizvodnje etanola bio je kraći u usporedbi s prethodnim uzgojem zbog drugačijeg sastava hranjive podloge. Naime, kao što je već napomenuto, E-PKO sadrži više glukoze, koja je preferirani izvor ugljika, a manje ksiloze. Tako je ovaj bioproces u usporedbi s procesom u HRCB-u na BKHKO, trajao dvostruko kraće, ali u usporedbi s bioreaktorom s miješalom i barbotirajućom kolonom 3 puta duže. Za potpunu asimilaciju glukoze ($Y_{glc}=17,98$

g L⁻¹) iz hranjive podloge plijesni *M. indicus* trebalo je 30 h, dok ostatak bioprocesa troši ksiložu ($Y_{ksi}=3,18 \text{ g L}^{-1}$). U prvom dijelu bioprocesa, dok plijesan troši glukozu, produktivnost proizvodnje etanola bila je $0,19 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, a u drugom dijelu, tijekom asimilacije ksiloze, iznosi $0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Ova vrijednost bila bi veća ($Pr_{etoh \text{ kis.max}}=0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) da je bioproces zaustavljen ranije, jer je već nakon 48 h, koncentracija ksiloze mala ($Y_{ksi}=0,61 \text{ g L}^{-1}$), a plijesan počinje trošiti proizvedeni etanol (Slika 42.). Glukoza je u ovom bioprocesu trošena brzinom od $0,101 \text{ h}^{-1}$, a ksiloza brzinom potrošnje od $0,093 \text{ h}^{-1}$. Produktivnost cjelokupne proizvodnje etanola ($Pr_{etoh \text{ uk.}}=0,110 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), veća je u usporedbi s uzgojima na BKHKO u barbotirajućoj koloni i HRCB-u, ali dvostruko manja od bioprocesa provedenih na E-PKO u ostalim bioreaktorskim sustavima (Tablica 25-26.). Tijekom bioprocesa u ovom tipu bioreaktora, plijesan je osim etanola i glicerola zbog uvjeta limitacije kisikom proizvela i ksilitol, čija je maksimalna koncentracija od $0,28 \text{ g L}^{-1}$ zabilježena u 53. h uzgoja, dok je do kraja bioprocesa vidljiv pad koncentracije na $0,07 \text{ g L}^{-1}$. Ujedno je proizvedena i biomasa, te je koeficijent konverzije supstrata u biomasu iznosio $0,181 \text{ g g}^{-1}$.

5.3.4. Usporedba kinetičkih parametara uspješnosti bioprocesa različitih tipova bioreaktora tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185

Usporedba brzina potrošnje supstrata i sinteze produkata, produktivnosti bioprocesa, koeficijenta konverzije supstrata u produkte za sve bioreaktorske sustave prikazani su u Tablici 25-26. Nakon provedenih uzgoja u različitim tipovima bioreaktora vidljive su razlike u efikasnosti proizvodnje etanola. Usporedba uzgoja u bioreaktoru s miješalom, barbotirajućoj koloni i HRCB-u na BKHKO vidi se da je najveća efikasnost proizvodnje etanola od 50% dobivena u bioreaktoru s miješalom. Efikasnost proizvodnje etanola u barbotirajućoj koloni iznosila je 30,8%, no raste na 50% skraćivanjem vremena trajanja bioprocesa. Najmanja efikasnost procesa proizvodnje etanola zabilježena je u HRCB-u i iznosila je 29,2%, i važno je napomenuti da je bioprocen u HRCB-u trajao najduže (144 h). Najveća koncentracija biomase od 7,51 g L⁻¹ dobivena je u barbotirajućoj koloni, dok je u bioreaktoru s miješalom postignuta koncentracija biomase 4,33 g L⁻¹. Kao i s proizvodnjom etanola, plijesan je u HRCB-u postignula najmanju koncentraciju biomase u usporedbi s ostalim bioreaktorskim sustavima ($\gamma_x=3,32$ g L⁻¹). Osim etanola i biomase, produkti uzgoja su i glicerol odnosno ksilitol. Prema literaturi, povećanjem aeracije ne dolazi do proizvodnje ksilitola iz ksiloze, već se ksiloza konvertira u ksilulozu i naposljetku u etanol (Millati i sur., 2008), što je vidljivo u rezultatima, jer je najveća koncentracija ksilitola postignuta u bioreaktoru s miješalom. Uzgoj *M. indicus* u bioreaktoru s miješalom korisnog volumena 1,5 L proveli su Sues i sur. (2005). Kao podlogu su koristili hidrolizat otpada smreke, koji je sadržavao značajno više ugljikohidrata, točnije 52,7 g L⁻¹. Koeficijent konverzije njihovog bioprocesa bio je 0,18 g g⁻¹, što je 35% manje od maksimalno postignutog koeficijenta u ovom radu, te neznatno veće od koeficijenta konverzije dobivenih u barbotirajućoj koloni i HRCB-u.

Efikasnosti bioprocesa provedenih na E-PKO, pokazuju nešto veće vrijednosti u usporedbi s vrijednostima dobivenima na BKHKO. Maksimalna efikasnost od 73,1% postignuta je u HRCB-u, dok su efikasnosti proizvodnje etanola u bioreaktoru s miješalom i barbotirajućoj koloni približno jednake, i iznose 54,9% odnosno 58,8%. Najveća efikasnost proizvodnje etanola u HRCB-u može se objasniti uvjetima uzgoja, jer plijesan u anaerobnim/mikroaerofilnim uvjetima proizvodi više etanola. Abedinifar i sur. (2009) tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* u anaerobnim uvjetima u bioreaktoru s miješalom na enzimskom hidrolizatu 20 g L⁻¹ rižine slame postigli su efikasnost procesa proizvodnje etanola od 76,5% ($Y_{\text{etoh/s}}=0,39$ g g⁻¹), a Millati i sur. (2008) su na enzimskom hidrolizatu drva uz aeraciju od 0,1 L min⁻¹ dobili koeficijent konverzije supstrata u etanol jednak 0,37 g g⁻¹, što daje efikasnost

procesa od 72,55%. S obzirom na sastav enzimskog hidrolizata predobrađenih kukuruznih oklasaka, koji sadržava male koncentracije ksiloze, i uvjete uzgoja nakon procesa u bioreaktoru s mješalom i barbotirajućoj koloni nije detektiran ksilitol, dok je nakon uzgoja u HRCB-u detektirana vrlo mala koncentracija ksilitola. Uspoređujući koncentracije biomase na kraju bioprocesa može se uočiti obrnuto proporcionalan trend utjecaja aeracije na koncentraciju biomase plijesni. Povećanjem aeracije dobivene su veće koncentracije biomase plijesni *M. indicus*. Iako je u HRCB-u proizvedeno najviše etanola, koncentracija biomase je najmanja od svih tipova bioreaktora ($\gamma_x=3,83 \text{ g L}^{-1}$). Maksimalan prinos biomase od $7,99 \text{ g L}^{-1}$ dobiven je u barbotirajućoj koloni, a u bioreaktoru s mješalom postignuta je koncentracija biomase od $7,00 \text{ g L}^{-1}$. Važno je napomenuti da je plijesan u svim uzgojima rasla u filamentoznom obliku. Na dimorfizam plijesni *M. indicus* utječu koncentracija šećera, posebno glukoze i sami uvjeti kultivacije. Pri manjim koncentracijama glukoze plijesan raste u filamentoznom obliku, a kada je koncentracija glukoze dovoljno visoka, dolazi do represije filamentoznog rasta i promjene morfologije te započinje rast u obliku pojedinačnih kolonija (Karimi i Zamani, 2013). Također na rast plijesni mogu utjecati i inhibitori poput furana i octene kiseline koji nastaju tijekom kiselinske hidrolize kukuruznih oklasaka (Karimi i Zamani, 2013). Zbog relativno visokih koeficijenata konverzije supstrata u produkte može se zaključiti da koncentracija furana od oko 1 g L^{-1} i octene kiseline između $2,3 \text{ g L}^{-1}$ i $5,0 \text{ g L}^{-1}$ nemaju negativan utjecaj na rast i razvoj plijesni. Lennartson i sur. (2009) proveli su uspješan uzgoj na hidrolizatu drva s $6,93 \text{ g L}^{-1}$ octene kiseline, $0,51 \text{ g L}^{-1}$ furfurala i $1,12 \text{ g L}^{-1}$ HMF. Furfural je u različitim ispitivanim uvjetima u potpunosti asimiliran, kao i octena kiselina prisutna u podlozi, dok se utjecaj octene kiseline primjećuje u koncentracijama većim od 10 g L^{-1} .

S obzirom na ove rezultate kao najbolji bioreaktorski sustav za provođenje uzgoja plijesni *M. indicus* i proizvodnju etanola na BKHKO i E-PKO pokazala se barbotirajuća kolona uz aeraciju od 2 L min^{-1} i temperaturu uzgoja od 30°C .

5.3.5. Uzgoj bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 na TOHP dobivenoj nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u mikroaerofilnim uvjetima bioreaktora s miješalom uz izvor svjetla

Nakon provedenih uzgoja plijesni *Mucor indicus* DSM 2185 na hranjivim podlogama od hidrolizata kukuruznih oklasaka uz dodatak 5 g L^{-1} CSL-a u različitim tipovima bioreaktora, biomasa plijesni je izdvojena centrifugiranjem, a TOHP je korišten za uzgoj bakterije *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s miješalom u mikroaerofilnim fotoheterotrofnim uvjetima pri temperaturi procesa od 30°C (Poglavlje 3.2.5.5.). Već je spomenuto da ove bakterije mogu rasti na alkoholima, organskim kiselinama i sličnim proizvodima metabolizma drugih mikroorganizama (Tabita i sur., 1995).

Podloga je na početku uzgoja sadržavala $6,68 \text{ g L}^{-1}$ arabinoze, $1,87 \text{ g L}^{-1}$ ksilitola i $1,77 \text{ g L}^{-1}$ etanola. Smanjenje koncentracije arabinoze zabilježen je nakon 2. dana uzgoja, i konstantno pada do kraja uzgoja. Na kraju uzgoja, podloga je sadržavala $3,26 \text{ g L}^{-1}$ arabinoze, iz čega se može zaključiti da su bakterije za rast koristile ovaj ugljikohidrat. Osim pada koncentracije arabinoze, vidljiv je i pad koncentracije ksilitola, kojeg su bakterije u potpunosti asimilirale do 5. dana trajanja procesa (Slika 44.). U podlozi su u 3. danu uzgoja detektirane octena kiselina i izopropanol, te njihove koncentracije do kraja uzgoja rastu do $5,79 \text{ g L}^{-1}$ i $10,95 \text{ g L}^{-1}$. Naime, *R. adriaticum* u uvjetima kada ima dovoljno dušika iz acetoacetyl-CoA može umjesto polihidroksibutirata proizvoditi izopropanol. Produktivnosti procesa proizvodnje octene kiseline i izopropanola bile su $0,034 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ octene i $0,065 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ izopropanola. Tijekom uzgoja praćena je i optička gustoća biomase i apsorbancija pigmenata (Slika 45.). Vidljivo je da optička gustoća svakim danom sve veća te da se s početnih 0,23, do kraja procesa poveća za 3,2 puta ($\text{OD}_{660}=0,73$). Apsorbancija pigmenata također raste svakim danom. Najveći pomaci u apsorbanciji pigmenata vidljivi su prva 3 dana, dok se tijekom ostatka bioprocesa apsorbancija pigmenata promijenila neznatno. Na kraju uzgoja *R. adriaticum* u bioreaktoru s miješalom, gravimetrijski određena koncentracija biomase bila je $2,26 \text{ g L}^{-1}$, što je najveća koncentracija biomase ove bakterije dobivena u ovom radu. Produktivnost bioprocesa s obzirom na biomasu bila je $0,013 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Ekstrakcijom bakterioklorofila *a* iz biomase na kraju samog bioprocesa dobivena je koncentracija ovog pigmenta od $14,62 \text{ mg g}^{-1}$, šta je manje u usporedbi s uzgojima provedenima u manjem mjerilu. U usporedbi s rezultatima iz rada Novak i sur. (2020), produktivnost proizvodnje biomase je 23,5% manja. No hranjiva podloga je u njihovom radu sadržavala po 3 g L^{-1} glukoze i ksiloze i uzgoji su provedeni u aerobnim uvjetima, što je vjerojatno razlog nešto manjeg prinosa

biomase, no koncentracija ekstrahiranog bakterioklorofila *a* bila je signifikantno veća nakon uzgoja u bioreaktoru s mješalom u usporedbi s njihovim rezultatima. Ujedno Novak i sur. (2020) ne izvještavaju o proizvodnji izopropanola i octene kiseline.

5.3.6. Rezultati uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 tijekom simultane saharifikacije i fermentacije u bioreaktoru s miješalom

Uzgoj *M. indicus* DSM 2185 u većem mjerilu proveden je na temelju rezultata dobivenih u prethodnim fazama istraživanja tehnikom simultane saharifikacije i fermentacije u bioreaktoru s miješalom korisnog volumena 1,5 L, pri temperaturi procesa od 30°C. Bioproces je vođen aerobno uz protok zraka od 1 L min⁻¹ te uz broj okretaja miješala od 100 o min⁻¹. Kao podloga korištena je MHP (Poglavlje 3.2.5.4.) koja je sadržavala 40 g L⁻¹ PKO dobivenih nakon predobrade u visokotlačnom reaktoru pri 180°C i vremenu zadržavanja od 10 min. Na početku procesa osim inokuluma u podlogu je dodano i 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blenda i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L.

Na Slici 43. prikazana je promjena koncentracije supstrata i produkata tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* u bioreaktoru s miješalom. Koncentracija glukoze raste prvih 5 h, te s početnih 10,31 g L⁻¹ raste na 15,74 g L⁻¹, nakon čega dolazi do smanjenja njene koncentracije. Glukoza nije detektirana u podlozi nakon 20 h uzgoja, no s obzirom na pad koncentracije ksiloze, plijesan je glukozu iz podloge iscrpila i prije tog vremena. Koncentracija ksiloze je dosegla svoju maksimalnu vrijednost u 7. h uzgoja ($\gamma_{ksi}=11,00$ g L⁻¹), što odgovara maksimalno mogućoj koncentraciji ksiloze dobivenoj 100% hidrolizom PKO. Plijesan je do 22 h, asimilirala 4,84 g L⁻¹ glukoze, dok je na kraju procesa u potpunosti potrošena. Prinos etanola svoj maksimum dostiže u 22. h procesa ($Y_{etoh}=16,46$ g L⁻¹), nakon čega dolazi do polaganog pada koncentracije etanola, te je na kraju procesa detektirana vrlo mala koncentracija etanola od 0,17 g L⁻¹. Osim etanola, plijesan *M. indicus* je proizvela i malu koncentraciju ksilitola i glicerola. Maksimalna koncentracija od 0,88 g L⁻¹ ksilitola i 0,26 g L⁻¹ glicerola zabilježene su nakon 25 h trajanja bioprocesa, no do kraja bioprocesa plijesan je utrošila sav proizvedeni ksilitol i 0,11 g L⁻¹ glicerola. Zbog prirode procesa simultane saharifikacije i fermentacije nije određena koncentracija biomase na kraju bioprocesa. S obzirom na ove rezultate, koeficijenti konverzije supstrata u etanol, ksilitol i glicerol na kraju procesa bili su 0,004 g L⁻¹ h⁻¹, 0 g L⁻¹ h⁻¹ i 0,003 g L⁻¹ h⁻¹. Ove vrijednosti poprimaju veće vrijednosti ako bi se skratilo trajanje bioprocesa. Tako je maksimalan koeficijent konverzije supstrata u etanola od 0,44 g g⁻¹ moguće dobiti skraćivanjem uzgoja na 22 h, dok bi maksimalni koeficijenti konverzije supstrata u glicerol ($Y_{glic/s}=0,007$ g g⁻¹) odnosno ksilitol ($Y_{xoh/s}=0,13$ g g⁻¹) bili postignuti nakon 25 h trajanja bioprocesa. Koeficijenti konverzije supstrata u produkte računani su uz pretpostavku da je došlo do 100% hidrolize sirovine i da su iz nje oslobođeni svi fermentabilni šećeri. S obzirom na rezultate, ukupna produktivnost bioprocesa iznosila je 0,004 g L⁻¹ h⁻¹, dok

skraćivanjem trajanja uzgoja na 22 h produktivnost proizvodnje etanola raste na $0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. De Oliveira i sur. (2018) su u svom istraživanju proveli proces simultane saharifikacije i fermentacije predobrađene šećerne trske upotrebom različitih volumnih udjela celulaza u bioreaktoru korisnog volumena 1 L s helikoidnim miješalom. Kao radni mikroorganizam koristili su *Saccharomyces cerevisiae*. Efikasnosti proizvodnje etanola u njihovim eksperimentima iznosile su 48% ili 52%, ovisno o trajanju procesa, dok je maksimalna produktivnost etanola od $0,51 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ dobivena nakon 24 h procesa.

Dobivena ukupna efikasnost proizvodnje etanola od 0,78% najniža je od svih provedenih uzgoja u bioreaktorima, no skraćivanjem vremena trajanja proizvodnje etanola na 22 h, moguće je postići efikasnost bioprocesa od 86,27%, maksimalnu postignutu u usporedbi s uzgojima u različitim tipovima bioreaktora na BKKHO i E-PKO. No, nedostatak bioprocesa je potrebna velika količina enzima što podiže cijenu procesa i nemogućnost jednostavnog odvajanja biomase od ostatka sirovine, ako bi se biomasa plijesni željela iskoristiti za izolaciju vrijednih polimera, hitina i hitozana.

5.4. Rezultati izdvajanja i pročišćavanja biokemikalija dobivenih tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u različitim bioreaktorskim sustavima

Separacijsku strategiju za obradu smjesa različitih sastava u produkte s unaprijed zadanom kvalitetom diktira postojanje azeotropije u mješavini etanola i vode. Najveću prepreku u proizvodnji etanola predstavljaju visoki troškovi energije koji su potrebni za odvajanje od suviška vode. Najčešće korištena metoda separacije u industriji je destilacija. Iako je destilacija snažna tehnika za odvajanje, ima i nekoliko nedostataka, od kojih su najznačajniji nemogućnost razdvajanja azeotropne smjese te prethodno spomenuti troškovi energije (Bušić i sur., 2018). Zbog toga se istražuju i alternativne metode za izdvajanje i pročišćavanje, koje se primjenjuju u pročišćavanju vode i otpadnih voda, kao što su različite membranske metode, ekstrakcija, istiskivanje plinom (eng. „gas stripping“), adsorpcija itd. Iako zahtijevaju manje energije od destilacije, potrebno je prevladati značajne tehničke izazove kako bi se navedene metode mogle koristiti u industriji (Poglavlje 3.2.6.).

5.4.1. Ekstrakcija etanola višim alkoholima

Ekstrakcija etanola otapalima, kao što su viši alkoholi, je alternativa destilaciji za izdvajanje etanola iz vodenih otopina kao što su fermentirane podloge, a predmet je mnogih istraživanja dijelom zbog potencijala da troši manje energije nego destilacija (Offeman i sur., 2005), a i zbog sve veće potražnje za proizvodima osjetljivim na promjene temperature, zahtjevima za visokom čistoćom proizvoda, učinkovitije opreme nove generacije i dostupnosti otapala s većom selektivnošću (Seader i sur., 2011)

5.4.1.1. Izbor pogodnog organskog otapala za izdvajanje etanola

5.4.1.1.1. Preliminarno istraživanje ponašanja trokomponentnih smjesi i izrada trokutnih trokomponentnih dijagrama

Kod odabira otapala za ekstrakciju, moraju se uzeti u obzir neka svojstva otapala koje se koristi za ekstrakciju tekuće-tekuće, a to su sposobnost razdvajanja faza, što manji potencijal za stvaranje emulzija ili pjene, kemijska stabilnost, biokompatibilnost s radnim mikroorganizmom, toksičnost itd. Za provođenje procesa ekstrakcije nepovoljan je sustav koji stvara stabilne emulzije. Rezultati istraživanja trokomponentnih smjesa prikazani na Slikama

46-49. te pokazuju u kojim omjerima komponente hranjive podloge stvaraju homogene smjese. Trokomponentne smjese su istraživane zbog činjenice da u ekstraktivnim procesima i vrlo male količine pojedine komponente mogu bitno utjecati na ponašanje kompletne smjese. Tipičan primjer koji ilustrira tu tvrdnju jest primjena emulgatora u smjesama ulja i vode. Na Slikama 46-49. vidljivo je da komponentne istraživane smjese, odnosno voda, etanol i svako od istraživanih organskih otapala, imaju širok koncentracijski pojas međusobne potpune topivosti. Iz tog razloga trebalo je proširiti istraživane koncentracijske omjere na područje u kojem te tri komponente stvaraju dvije razdvojene smjese: vodenu fazu (otopina etanola i otapala s dominantnim udjelom vode) i organsku fazu (otopina vode i etanola u organskoj fazi).

5.4.1.1.2. Ravnotežne koncentracije, razdvajanje faza i izrada binodalnih krivulja za trokomponentne smjese etanol-voda-organsko otapalo

Plinskom kromatografijom su analizirani uzorci dobiveni nakon višekratnog mješanja i mirovanja pojedinog otapala (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohola), etanola i vode. Maseni udjeli etanola te maseni udjeli vode i organske faze u pojedinim fazama korišteni su za izradu ravnotežnih binodalnih krivulja (Slika 50-53.). Dobiveni rezultati pokazuju da istraživani viši alkoholi stvaraju dva jasno odvojena sloja (rafinat i ekstrakt) u širokom rasponu masenih udjela pri statičkim uvjetima, što znači da se mogu koristiti u postrojenju za ekstrakciju jer se u tehnološkom procesu mogu dobro razdvojiti od vodene faze. Ovo se može vidjeti i iz dobivenih binodalnih krivulja (Slike 50-53.). Binodalne krivulje pokazuju da trokomponentne smjese pojedinih otapala, etanola i vode, imaju široko područje koncentracijskih omjera u kojima se stvaraju dvije međusobno razdvojene faze, što je jedan od uvjeta uspješne ekstrakcije. Usporedba binodalnih krivulja otkriva da sustav pentan-1-ol/etanol/voda ima najširi raspon koncentracija u smjesi koje rezultiraju homogenom trokomponentnom otopinom. Slijede ga sustavi oktan-1-ol/etanol/voda i nonan-1-ol/etanol/voda čije koncentracijsko područje stvaranja nehomogenih smjesa je šire od sustava pentan-1-ol/etanol/voda. Najšire područje koncentracijskih omjera komponenti u kojem dolazi do razdvajanja faza na ekstrakt i rafinat ima sustav oleil alkohol/etanol/voda. Otapala se na temelju ovih rezultata mogu svrstati po pogodnosti za ekstrakciju etanola iz vodenih fermentiranih podloga u redoslijed: oleil alkohol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i pentan-1-ol. Sastavi organske i vodene faze te izračunati koeficijenti raspodjele i faktori separacije prikazani su u Tablici 27.

5.4.1.2. Istraživanje učinkovitosti razdvajanja organske faze u prisutnosti sastojaka fermentirane hranjive podloge

Svaki dodani sastojak u nehomogenim smjesama kemijski različitih otapala bitno utječe na razdvajanje faza i na ponašanje kompletnih sustava. Na Slici 54. vide se rezultati razdvajanja organske faze i BKHKO uz prisutnost radnog mikroorganizma. Uzet je uzorak iz organske faze nakon 4 sata te je pod mikroskopom utvrđeno da praktički nema stanica plijesni. Ujedno je bila primjetna mutež organske faze i to za sve primijenjene više alkohole, što upućuje na zaključak da se u prisustvu hidrolizata lignoceluloznog kompleksa u organskoj fazi stvaraju emulzije koje se sporo razdvajaju. S obzirom na te rezultate bilo je interesantno za istražiti kako etanol utječe kao sastojak hranjive podloge na ponašanje sustava koji se sastoji od organske faze, BKHKO i stanica plijesni. Dodatkom etanola smanjuje se mogućnost nastajanja emulzije u organskoj fazi što je vidljivo po bistrom gornjem sloju. (Slika 54.). I u ovom slučaju su stanice plijesni nakon 4 h mirovanja bile pretežito prisutne u donjoj vodenoj fazi. Ta činjenica je potvrđena i pregledom obiju faza svjetlosnim mikroskopom.

5.4.1.3. Istraživanje ekstraktivnih svojstava ekstraktanata u kontinuiranom sustavu za ekstrakciju

U preliminarnim eksperimentima u epruvetama dokazano je da kod svih sustava (organsko otapalo/voda/etanol) u mirovanju dolazi do razdvajanja slojeva organske i vodene faze. Ujedno je primijećeno da u nekim sustavima u određenim koncentracijskim omjerima dolazi do pojave manjeg ili većeg sloja emulzije koji se teško razdjeljivao na dvije faze. Stoga je bilo nužno provjeriti kako bi razdvajanje faza funkcioniralo u kontinuiranom sustavu za razdvajanje. Određen je i minimalno potrebni Reynoldsov broj miješala za dobro dispergiranje ekstraktanata u podlozi unutar sekcije za miješanje (Tablica 28.). Rezultati pokazuju da različita otapala imaju različiti odnos prema vodenoj fazi u pogledu potrebne mehaničke sile za dobivanje potrebne razdjelne površine za prijenos mase i potreban stupanj disperzije organske u vodenoj fazi. Pentan-1-ol i nonan-1-ol su se dobro dispergirali u vodenoj fazi u sekciji za miješanje uz Reynoldsov broj miješala reda veličine 5800 ($Re_i=5787$ za pentan-1-ol; $Re_i=5764$ za nonan-1-ol). Nasuprot tome oktan-1-ol i oleil alkohol su trebali nešto manje Reynoldsove brojeve miješala ($Re_i=4953$ za oktan-1-ol; $Re_i=4710$ za oleil alkohol). U svim pokusima razdjeljivanja faza pokazalo se da primijenjeni Re brojevi u vertikalnoj koloni za razdvajanje omogućuju da se svi ekstrakti dobro izdvoje na površini vodene faze.

Treba napomenuti da pentan-1-ol i nonan-1-ol stvaraju relativno visoki sloj emulzije između ekstrakta i rafinata. Nasuprot tome, oleil alkohol je u koloni za razdjeljivanje stvarao relativno čisti sloj rafinata i vrlo slabu emulziju u ekstraktu, dok je oktan-1-ol u koloni za razdjeljivanje stvarao čisti sloj rafinata i ekstrakta. Ovi rezultati upućuju na to da se primjenom odgovarajuće brzine strujanja u vertikalnim kolonama za razdjeljivanje može postići dobro razdvajanje ekstrakta od rafinata pri čemu bi se rafinat odvodio s dna kolone, a ekstrakt s vrha kolone. U tom slučaju bi otapala pentan-1-ol i nonan-1-ol trebala dužu centralnu sekciju kolone kako bi se nastale emulzije mogle uspješno razdvojiti na ekstrakt i rafinat. Nakon ekstrakcije etanola u ovom sustavu dobivene frakcije su analizirane plinskom kromatografijom (Tablica 29.) Rezultati pokazuju da je najniži volumni udio etanola u ekstraktu postignut u frakciji s oleil alkoholom, a najveći s pentan-1-olom. Zadovoljavajući sastav rafinata postignut je s oktan-1-olom kao ekstraktantom, dok bi se za ostala otapala trebali provesti dodatni stupnjevi ekstrakcije za postizanje željene koncentracije etanola u rafinatu ($w_{EtOH} = 4\%$).

5.4.1.4. Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije etanola

5.4.1.4.1. Izračun broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije za šaržnu ekstrakciju

Grafički su određeni potrebni brojevi teoretskih stupnjeva za šaržnu ekstrakciju etanola višim alkoholima. Rezultati su prikazani u Tablici 30. Ako bi se za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju kao ekstraktant koristio pentan-1-ol kako bi se dobio željeni maseni udio etanola u rafinatu veći od 4%, ekstrakcija bi se mogla izvesti u tri stupnja. Za oktan-1-ol nije bilo moguće odrediti potreban broj stupnjeva za višestupanjsku šaržnu ekstrakciju kako bi se dobila takva koncentracija etanola u rafinatu. Uporabom oktan-1-ola dobiven je koeficijent razdjeljenja jednak 1, što znači se tijekom prvog stupnja ekstrakcije grafički dobila jednaka količina etanola u ekstraktu i rafinatu. Nonan-1-ol i oleil alkohol pokazuju nešto bolju sposobnost izdvajanja etanola u odnosu na oktan-1-ol, ali je za oleil alkohol grafički bilo nemoguće odrediti konačnu količinu otapala za dobivanje $4\% \text{ m m}^{-1}$ etanola u rafinatu jer točke ekstrakta iz prvog i drugog stupnja padaju u istu točku zbog nagiba ravnotežnih linija. Korištenjem nonan-1-ola kao ekstraktanta u višestupanjskoj šaržnoj ekstrakciji, za dobivanje masenog udjela etanola od 4% u rafinatu bilo bi potrebno 8 stupnjeva ekstrakcije.

5.4.1.4.2. Određivanje broja potrebnih stupnjeva ekstrakcije za kontinuiranu ekstrakciju

Grafičkim putem je određen i broj potrebnih stupnjeva ekstrakcije za kontinuiranu ekstrakciju, te minimalan protok ekstraktanta u protustrujnoj kontinuiranoj ekstrakciji i dobiveni udjeli etanola u rafinatu i ekstraktu (Tablica 31.). Rezultati su dobiveni uz pretpostavku da u uređaj za ekstrakciju ulazi 1000 kg h^{-1} fermentirane hranjive podloge koja sadrži maseni udio etanola od 6,3% s ciljem da se u rafinatu dobije koncentracija 4% m m⁻¹. Korištenjem pentan-1-ola kao ekstraktanta moguće je postići željeni udio etanola u rafinatu s najmanjom količinom otapala u odnosu na ostale više alkohole, no ako bi se ekstrakcija provodila u jednom stupnju, potreban protok pentan-1-ola trebao bi biti veći od protoka otapala potrebnog za svaki pojedini stupanj od onog ako bi se ekstrakcija izvodila u više stupnjeva. Kako bi se u jednom stupnju postigla željena koncentracija etanola u rafinatu, oktan-1-ol i nonan-1-ol za isti ulazni protok fermentirane podloge zahtijevaju veći protok otapala u usporedbi s pentano-1-olom. Primjenom oleil alkohola kao ekstraktanta postignut je željeni maseni udio etanola u rafinatu u 1. stupnju, no uz daleko veći ulazni protok otapala od 2655 kg h^{-1} , što je razočaravajuće jer se oleil alkohol može najlakše proizvesti iz obnovljivih izvora, redukcijom karboksilne grupe oleinske kiseline koja je sastojak mnogih biljnih ulja i životinjskih masti, te se može naći i u sastavu biomase plijesni, među kojima je i radni mikroorganizam korišten u ovom radu *Mucor indicus*. Obzirom na potrebne količine ekstraktanta jedino bi se upotrebom pentan-1-ola postigao željeni cilj, smanjenje mase koju je potrebno podvrgnuti destilaciji te time uštedjeti na toplinskoj energiji. Naime iz 1000 kg h^{-1} fermentirane podloge, dobiveno bi bilo $550,17 \text{ kg h}^{-1}$ ekstrakta odnosno 528 kg h^{-1} otapala za $22,17 \text{ kg h}^{-1}$ etanola.

5.4.2. Izdvajanje ksilitola

Provedeni su preliminarni eksperimenti izdvajanja ksilitola iz fermentirane podloge primjenom antiotapala (otapalo u kojem je ksilitol loše topljiv) koja smanjuju topljivost ksilitola u sustavu voda-otapalo u zasićenoj otopini ksilitola ($\gamma_{xoh}=700 \text{ g L}^{-1}$). Izolacija ksilitola je provedena iz modelne otopine ksilitola u vodi i modelne otopine ksilitola u BKHKO. BKHKO korišten je jer je u njemu nakon procesa proizvodnje etanola detektirana i određena koncentracija ksilitola.

Samo izdvajanje ksilitola iz fermentiranih hranjivih podloga najzahtjevniji je dio proizvodnje zbog niske koncentracije proizvoda i kompleksnog sastava hranjive podloge (de Faveri i sur., 2004). Primjenom različitih omjera modelnih otopina i antiotapala, kao što su aceton, etanol i isopropanol, provedena je izolacija ksilitola kristalizacijom. Naime, topljivost ksilitola u antiotapalima je vrlo niska, te dolazi do taloženja kristala ksilitola iako se dodatkom ovih otapala razrijeđuju otopine s ksitolom (S. Wang i sur., 2007). Iskorištenja postupaka kristalizacije ksilitola iz modelnih otopina uz dodatak antiotapala kretala su se u rasponu od 0% do 30,95% (Tablica 32.). Kao najnepogodnije otapalo za izdvajanje ksilitola pokazao se izopropanol. Naime, pri omjeru 1:1 modelne otopine i izopropanola, nije došlo do taloženja i kristalizacije ksilitola, a povećanjem omjera na 1:4 uspješnost procesa izolacije iz modelne otopine ksilitola u vodi i hidrolizatu se neznatno povećavaju na 10,99% i 11,74%. Povećanjem volumnog udjela etanola u modelnim otopinama dolazi i do povećanja prinosa ksilitola, a samim time i produktivnosti procesa izolacije ksilitola. Naime, iskorištenja procesa izolacije iz vodene modelne otopine i modelne otopine hidrolizata rastu s 9,89% i 9,97% na 14,92% i 17,87%. Najveće iskorištenje procesa izolacije ksilitola iz vodene otopine postignuto je upotrebom acetona i iznosi 30,95%, dok je iskorištenje postupka izolacije iz modelne otopine hidrolizata 3 puta manja, i iznosi svega 9,95%. Najveće iskorištenje izolacije od 17,87% iz modelne otopine hidrolizata dobiveno je upotrebom apsolutnog etanola u omjeru 1:1. U usporedbi s kristalizacijom koja je potaknuta dodatkom otopine etanola (1:1), koju su proveli Wei i sur. (2010), pratio se prinos ksilitola nakon 24 i 48 h pri čemu su ostvareni prinosi 52,67% odnosno 56,67%.

Kristali ksilitola istaloženi iz vodene otopine ksilitola bili su bijele boje, dok su kristali ksilitola izolirani iz hidrolizata otpadne trave bili smeđe obojeni (Slika 47). Obojenost kristala ksilitola je posljedica interferencije ksilitola s drugim sastojcima BKHKO kao što su zaostali

šećeri, ksiloza i arabinoza, različite anorganske soli, te druge nečistoće, kao što je lignin, koje utječu na kristalizaciju, prinos, čistoću i oblik kristala (Wei i sur., 2010) .

5.4.3. Izdvajanje hitina i hitozana iz biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185

Iz biomase plijesni *M. indicus* DSM 2185 izolirani su hitin i hitozan nakon provedenih procesa proizvodnje etanola na BKHKO i E-PKO u različitim bioreaktorskim sustavima. Prinosi procesa izolacije hitina i hitozana prikazani su u Tablici 33.

Stanična stijenka plijesni *M. indicus* bogata je hitinom i hitozanom (Satari i sur., 2016). Udio hitozana u biomasi plijesni varira u rasponu od 5% do 10% suhe tvari biomase ili 30% do 40% stanične stijenke. Značajne količine biomase formiraju se tijekom aerobnih procesa, a udio hitina i hitozana mijenja se s promjenom morfologije plijesni iz rasta u obliku pojedinačnih stanica u filamentozni oblik (Sharifyazd i Karimi, 2017). Izolacija hitin i hitozana iz biomase plijesni provedena je zbog mogućnosti primjene u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Sharifyazd i Karimi, 2017).

Usporedbom prinosa hitina i hitozana iz suhe tvari biomase plijesni dobivene nakon uzgoja u različitim bioreaktorskim sustavima vidi se da oni variraju ovisno o primjenjenim uvjetima uzgoja. Najveći prinos hitina i hitozana nakon uzgoja na BKHKO dobiven je u barbotirajućoj koloni. Koncentracija biomase na kraju uzgoja bila je $5,00 \text{ g L}^{-1}$, a iz biomase je izolirano $0,30 \text{ g g}^{-1}$ hitina i $0,16 \text{ g g}^{-1}$ hitozana. Nakon uzgoja plijesni u bioreaktoru s miješalom, dobivena je nešto manja koncentracija biomase ($\gamma_x=4,34 \text{ g L}^{-1}$), a i prinosi hitina i hitozana su neznatno manji te iznose $0,21 \text{ g g}^{-1}$ hitina i $0,13 \text{ g g}^{-1}$ hitozana. Najmanja koncentracija biomase dobivena je nakon 144 h uzgoja provedenog u HRCB-u. Zbog uvjeta procesa (mikroaerofilni uvjeti i sobna temperatura uzgoja) dobiveno je oko 45% manje biomase u usporedbi s barbotirajućom kolonom i 24% manje u usporedbi s bioreaktorom s miješalom. Prinosi hitina i hitozana iz biomase plijesni formirane tijekom uzgoja u HRCB-u bili su gotovo dvostruko manji i iznosili su $0,14 \text{ g g}^{-1}$ hitina i $0,08 \text{ g g}^{-1}$ hitozana.

Primjenom različitih bioreaktorskih sustava napravljeni su uzgoji na E-PKO. S obzirom da je hranjiva podloga u ovom slučaju sadržavala veće količine glukoze, koja je preferirani izvor ugljika, u usporedbi s BKHKO, dobivene su veće vrijednosti koncentracije biomase na kraju procesa. I ovdje je najveća koncentracija biomase dobivena nakon uzgoja u barbotirajućoj koloni. Koncentracija biomase bila je 159% veća u usporedbi s uzgojem plijesni u istoj izvedbi bioreaktora, no prinos hitina i hitozana bio je nešto manji. Prinos hitina bio je $0,22 \text{ g g}^{-1}$, a

hitozana $0,012 \text{ g g}^{-1}$, što je za $0,08 \text{ g g}^{-1}$ odnosno $0,04 \text{ g g}^{-1}$ manje od prinosa hitina i hitozana nakon uzgoja u barbotirajućoj koloni na BKHKO. Prinos hitina i hitozana iz biomase dobivene nakon uzgoja u bioreaktoru s miješalom bili su nešto manji i iznosili su $0,18 \text{ g g}^{-1}$ i $0,09 \text{ g g}^{-1}$ uz koncentraciju biomase na kraju uzgoja od $7,00 \text{ g L}^{-1}$. Na kraju uzgoja na E-PKO u HRCB-u dobiveno je $3,83 \text{ g L}^{-1}$ biomase. Ta biomasa je sadržavala $0,15 \text{ g g}^{-1}$ hitina i $0,07 \text{ g g}^{-1}$, najmanje od svih upotrijebljenih bioreaktorskih sustava.

Sharifyazd i Karimi (2017) su u svom istraživanju odredili prinos hitina i hitozana u biomasi od $0,21 \text{ g g}^{-1}$ odnosno $0,16 \text{ g g}^{-1}$. S obzirom na ove rezultate, prinos hitina dobiven nakon uzgoja plijesni *M. indicus* na BKHKO u barbotirajućoj koloni bio je za oko 40% veći, dok je postignuti isti prinos hitozana. Osim aeracije na udio hitina i hitozana u biomasi plijesni *M. indicus* utječe i temperatura uzgoja pri čemu je udio hitina najveći pri 28°C te se smanjuje s povećanjem temperature, za razliku od hitozana čiji je udio najmanji pri 28°C te se povećava s porastom temperature (Sharifyazd i Karimi, 2017).

5.5. Materijalne bilance sirovina i proizvoda u integriranom biorafinerijskom sustavu proizvodnje specifičnih biokemikalija i biogoriva iz lignocelulozne sirovine

Analiza životnog ciklusa (eng. "Life Cycle Analysis" - LCA) je međunarodno standardizirana metodologija (ISO 14040:2006) koja se bavi proučavanjem utjecaja određenog proizvoda na okoliš te materijalnim i energetske resursima vezanim za taj proizvod. LCA je jedna od opće prihvaćenih metoda kojima se može procijeniti utjecaj različitih tehnoloških procesa u svim fazama proizvodnje određenog proizvoda i samog proizvoda na okoliš. Prasad i sur. (2016) proveli su LCA analizu različitih metoda predobrade lignoceluloze, Muñoz i sur. (2013) koristili LCA za procjenu održivosti proizvodnje bioetanola iz različitih nusproizvoda poljoprivredne industrije, a Cherubini i Jungmeier (2010) koristili su LCA za analizu koncepta održivosti biorafinerije za proizvodnju bioetanola, bioenergije i kemikalija iz divljeg prosa.

Kao konačan korak u ovom radu provedena je analiza održivosti proizvodnje bioetanola i biokemikalija iz lignocelulozne sirovine tj. kukuruznih oklasaka. Za izradu procesne sheme i proračuna materijalnih bilanci korišteni su rezultati dobiveni tijekom izrade ove doktorske disertacije. Također, izrađene su materijalne bilance iz podataka dostupnih u literaturi (Mardetko i sur., 2018; Morikawa i sur., 2014; Saha i sur., 2013), a dobiveni rezultati su uspoređeni s ciljem pronalaska optimalnog procesa za dobivanje bioetanola.

Materijalna bilanca (Slika 56) pokazuje da je za proizvodnju 1 kg etanola potrebno 7,48 kg kukuruznih oklasaka. Prije predobrade u visokotlačnom reaktoru, kukuruzni oklasci se usitnjavaju pomoću mlina čekićara s veličinom sita 5 mm. Nakon mljevenja, kukuruzni oklasci se tretiraju u visokotlačnom reaktoru pri temperaturi 180°C i vremenu zadržavanja 10 min uz dodatak 0,5% m vol⁻¹ sumporne kiseline. Omjer čvrste frakcije (kukurni oklasci) i tekuće frakcije (0,5% sumporna kiselina) iznosi 1:20, odnosno za predobradu 7,48 kg kukuruznih oklasaka potrebno je utrošiti 149,6 L H₂O i 0,75 L H₂SO₄. Nakon predobrade, kruta i tekuća faza se odvajaju pomoću centrifugalnog separatora, čime se dobiva 5,74 kg PKO i 106,1 L BKHKO, koji se hladi u izmjenjivaču topline. Za neutralizaciju tekuće frakcije troši se oko 0,65 kg kalcijevog hidroksida, a dobiva oko 1,5 kg gipsa kao nusprodukta. Neutralizirani BKHKO sadržava 0,46 kg glukoze, 2,5 kg ksiloze, 0,15 kg arabinoze, 1,53 kg lignina topljivog u kiselini, 0,10 kg furana, 0,41 kg octene i 0,16 kg mravlje kiseline. Od čvrste faze se za potrebe enzimске hidrolize odvajaju 3,35 kg PKO koji se sastoje od 1,86 kg glukoze, 0,04 kg ksiloze,

0,02 kg arabinoze i 0,91 kg lignina i pepela. Enzimaska hidroliza se provodi u bioreaktoru u kojem se nalazi MHP koja je pripremljena miješanjem 77,2 L H₂O i 0,39 kg CSL-a. Dodavanjem 3,35 kg PKO u bioreaktor postiže se koncentracija sirovine od 40 g L⁻¹. U bioreaktor se dodaje i 2% vol vol⁻¹ Cellulase enzyme blenda (1,67 L) i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L (4,34 L). Proces enzimske hidrolize se provodi pri 50°C kroz 24 h, nakon kojeg se oslobađa 96% ugljikohidrata iz PKO. Centrifugalnim separatorom se odvaja zaostali lignin od E-PKO.

Fermentacije se odvijaju u bioreaktorima s miješalom pri aerobnim uvjetima i na 30°C. Za naciepljivanje 106,1 L BKHKO potrebno je 8,61 L inokuluma plijesni *Mucor indicus*, uzgojene u propagatoru, te je potrebno dodati i 0,57 kg CSL-a. Nakon provedene fermentacije dobije se 114,67 L fermentirane podloge koja sadržava neiskorištenih 0,15 kg arabinoze i 1,53 kg LTK te 1 L etanola, 0,49 kg biomase plijesni, 0,93 kg ksilitola i 0,04 kg glicerola. Biomasa se odvaja od podloge pomoću centrifugalnog separatora.

E-PKO se naciepljuje sa 6,8 L inokuluma plijesni *Mucor indicus*, čime se na kraju procesa dobije 90,50 L fermentirane podloge koja u svom sastavu ima 0,02 kg neiskorištene arabinoze te 1 kg etanola, 0,63 kg biomase plijesni, 0,02 kg ksilitola i 0,03 kg glicerola. Upotrebom centrifugalnog separatora 90,50 L supernatanta odvaja se od 0,63 kg biomase plijesni. Kombiniranjem supernatanta, dobivenih nakon procesa fermentacije BKHKO i E-PKO, dobije se 205,2 L supernatanta koji se u koloni za ekstrakciju podvrgava ekstrakciji etanola dodatkom 12,41 L pentan-1-ola. Nakon ekstrakcije tekuće-tekuće 13,91 L ekstrakta podvrgava se destilaciji, čime se dobiva 1 kg etanola i 12,41 L pentan-1-ola koji se reciklira u novom postupku izdvajanja etanola iz supernatanta. Preostalih 203,7 L rafinata koristi se u anaerobnom fotoheterotrofnom uzgoju bakterije *Rhodovulum adriaticum* u bioreaktoru s miješalom. Za inokulaciju je potrebno pripremiti 15,28 L inokuluma ove bakterije. Nakon provedene uspješne fermentacije, u centrifugalnom separatoru se 218,98 L fermentirane podloge odvaja na 218,52 L supernatanta i 0,46 kg biomase bakterije *Rhodovulum adriaticum*. Destilacijom 218,52 L supernatanta dobije se 2,39 kg izopropanola i 1,27 kg octene kiseline, a iz biomase je moguće izolirati 6,73 g pigmenata.

Usporedbom ovih rezultata s rezultatima iz Marđetko i sur. (2018) može se primijetiti smanjenje potrebne količine sirovine. Prema Marđetko i sur. (2018), za proizvodnju 1 kg etanola potrebno je 22,95 kg pšenične slame. Nakon usitnjavanja, sirovina se tretira u visokotlačnom reaktoru na 180°C, 10 min uz dodatak 0,5% m vol⁻¹ sumporne kiseline. Za

tretman 21,3 kg pšenične slame potrebno je utrošiti 456,3 kg vode i 2,3 kg sumporne kiseline. Nakon predobrade, odvajaju se kruta i tekuća frakcija hidrolizata pšenične slame. Za neutralizaciju tekuće frakcije troši se 1,39 kg kalcijevog hidroksida, a dobiva se 3,19 kg gipsa. Čvrsta frakcija hidrolizata pšenične slame s oko 13,6 kg suhe sadrži preko 60% glukana (8,81 kg) i oko 20% netopivog lignina (2,91 kg). Tekuća frakcija (227 L) dobivena nakon predobrade koristila se kao hranjiva podloga za anaerobni uzgoj radnog mikroorganizma *S. cerevisiae* Y9 i proizvodnju 1 kg etanola. Hranjivoj podlozi potrebno je dodati ukupno 0,5 kg DAP-a i 0,5 kg DAS-a te 0,38 kg kvašćevog ekstrakta. Za pripremu ukupno 22,7 L inokuluma troši se po 0,023 kg diamonijevog fosfata i sulfata, 0,034 kg kvašćevog ekstrakta te 0,341 kg glukoze. Proizvodnja 1 kg etanola pri stupnju konverzije 0,327 g g⁻¹ i efikasnosti 64,01% zahtjeva ukupno 3,06 kg supstrata.

Prema Morikawa i sur. (2014), usitnjena pšenična slama predobrađena je razrijeđenom sumpornom kiselinom (0,5%) na 140°C, 1 h. Tekući hidrolizat je korišten za proizvodnju biodizela, dok je čvrsti dio hidrolizata korišten za dobivanje bioetanola procesom simultane saharifikacije i fermentacije (SSF). Nakon predobrade, izvršena je filtracija suspenzije nakon čega je čvrsta frakcija dodatno oprana određenom količinom vode, a filtrat spojen s tekućom frakcijom hidrolizata pšenične slame. Proces SSF odvijao se na sobnoj temperaturi, pri pH 5,0 u trajanju od 96 h. Čvrsta frakcija je otopljena u određenoj količini deionizirane vode te je dodan enzim celulaza Cellic Ctec2. Nakon 24 h, suspenzija je inokulirana radnim mikroorganizmom *S.cerevisiae* CICC 31014. Za proizvodnju 1 kg etanola, potrebno je 9,9 kg pšenične slame za čiju se predobradu utroši 0,5 kg sumporne kiseline i ukupno 118,4 kg vode. Iz čvrste frakcije hidrolizata pšenične slame mase 29,7 kg, SSF procesom proizvedena je 1 kg etanola, a utrošeno je 99 L deionizirane vode, 0,22 kg DAS-a, po 0,55 kg DAP-a i CSL-a te 0,50 kg enzima. Na kraju fermentacije je izdvojeno 3,37 kg čvrstog ostatka s udjelom lignina oko 63%.

Saha i sur. (2013) su proveli istraživanje uspješujući proces odvojene enzimske hidrolize i fermentacije (SHF) sa SSF procesom za proizvodnju bioetanola iz pšenične slame. Ispitana je i uspješnost enzimske hidrolize i fermentacije na hidrolizatu koji nije prošao detoksifikaciju nakon predobrade te su dobiveni rezultati uspoređeni s hidrolizatom na kojem je odrađena detoksifikacija pomoću gljivice *C. ligniaria* NRRL 30616. Na temelju eksperimentalnih podataka iz procesa odvojene hidrolize i fermentacije, bez detoksifikacije hidrolizata, izrađena je materijalna bilanca proizvodnje 1 kg etanola. Nakon usitnjavanja

sirovine u mlinu čekičaru, izvršena je predobrada pomoću 0,5% m vol⁻¹ sumporne kiseline na temperaturi od 160°C, 10 min u rotirajućem bioreaktoru od nehrđajućeg čelika s infracrvenim grijanjem. Za proizvodnju 1 kg etanola, tretirano je 6,5 kg pšenične slame s 94,5% suhe tvari te je utrošeno 75,4 kg vode i 0,38 kg kiseline. U istom bioreaktoru je izvršena enzimska hidroliza bez prethodne detoksifikacije tekuće faze na 45°C, 72 h pri pH 5.0 dodatkom 0,21 kg enzima. Nakon odvajanja čvrstog ostatka pšenične slame, 75,19 L tekuće frakcije hidrolizata je iskorišteno za fermentaciju pomoću kvasca *S. cerevisiae* NRRL Y-2034. Fermentacija se odvijala na 37°C, 94 h pri pH iznad 5,0. Utrošeno je 0,011 kg CSL-a, 0,011 kg ekstrakta slada te 0,019 kg peptona. Na kraju fermentacije dobiveno je 1 kg etanola, 1,44 kg ksiloze, 0,23 kg arabinoze i 0,08 kg galaktoze u volumenu od 75,76 L.

Usporedbom ovih procesa najuspješniji bi bio proces prema Saha i sur. (2013), u kojem je za proizvodnju 1 kg etanola potrebno 6,5 kg pšenične slame, u usporedbi sa 7,48 kg kukuruznih oklasaka potrebnih za dobivanje 1 kg etanola u ovom radu. Međutim, potrebno je istaknuti da se radi o različitim sirovinama koje također imaju značajan utjecaj na provođenje i prinos bioprocasa.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

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

1. Optimalna temperatura za predobradu lignoceluloznih sirovina (pšenična slama, otpadna trava, kukuruzovina i kukuruzni oklasci) u visokotlačnom reaktoru od svih testiranih (od 160°C do 200°C) je 180°C. Nakon predobrade pri vremenima zadržavanja (t_z) 1,5 i 10 min i 0,5% m vol⁻¹ sumporne kiseline dobivene su dvije faze: čvrsta i tekuća faza predobrađene sirovine. Najveća ukupna masa šećera u tekućoj fazi od 148,1 g dobivena je nakon predobrade kukuruznih oklasaka pri $t_z = 10$ min, dok su pri t_z 1 min i 5 min dobivene nešto manje mase 100,67 g i 115,42 g. Predobradom otpadne trave dobivene su mase ukupnih ugljikohidrata 123,5 g, 106 g i 112,2 g. Predobradom pšenične slame pri ovim uvjetima ukupna masa šećera kretala se u rasponu od 62,69 g do 110,89 g, a predobradom kukuruzovine masa svih šećera prisutnih u tekućoj fazi hidrolizata bila je u rasponu od 87,46 g do 121,67 g. U svim tekućim fazama kiselinskih hidrolizata najveći je bio maseni udio ksilana, praćen udjelom arabinana dok je najmanji bio udio glukana.
2. Povećanjem temperature i vremena zadržavanja predobrade rastu koncentracije inhibitora bioprocesa. Maksimalne koncentracije furana zabilježene su pri temperaturi 200°C, te su se ovisno o sirovini, kretale u rasponu od 469,21 mg L⁻¹ do 1684,45 mg L⁻¹. Pri istoj temperaturi zabilježene su i najveće koncentracije octene i mravlje kiseline, i to između 0,59 g L⁻¹ i 4,69 g L⁻¹ octene kiseline te od 0,79 g L⁻¹ do 1,86 g L⁻¹ mravlje kiseline. Pod utjecajem visoke temperature od 200°C pri predobradi zabilježena je i prisutnost levulinske kiseline u rasponu od 0,04 g L⁻¹ do 0,40 g L⁻¹.
3. Analizom sastava svih čvrstih faza hidrolizata dobivenih nakon kiselinske predobrade lignoceluloznih sirovina, kao sirovina u proučavanju enzimske hidrolize odabrani su PKO dobiveni nakon predobrade na 180°C i t_z 10 min, zbog malog masenog udjela ksilana ($w_{ksi}=1,11 \pm 0,07\%$) i velikog masenog udjela glukana ($w_{glc}=55,58 \pm 3,48\%$).
4. Iz rezultata enzimskih hidroliza PKO pri temperaturi od 50°C i pH 5,0 pomoću Viscozyme L i Cellulase, enzyme blend može se zaključiti da Viscozyme L ima veći utjecaj na hidrolizu ksilana, a Cellulase, enzyme blend na hidrolizu glukana. Provedbom enzimske hidrolize s koncentracijama enzima od 1% vol vol⁻¹ povećanje koncentracije supstrata od 10 g L⁻¹ do 40 g L⁻¹ značajno utječe na smanjenje stupnja

hidrolize ukupnih ugljikohidrata. Dok već samom primjenom 10% vol vol⁻¹ enzima, koncentracija supstrata nema značajan utjecaj na stupanj hidrolize.

5. Na temelju provedenih eksperimenata najveći stupanj hidrolize ukupnih ugljikohidrata 40 g L⁻¹ PKO od 84,88% dobiven je pomoću kombinacije enzima 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5% vol vol⁻¹ Viscozyme L. Korištenjem DesignExpert kao optimalni volumni udio enzima, za postizanje maksimalnog stupnja hidrolize ukupnih ugljikohidrata od 92,66%, dobiveno je 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L. Povećanje koncentracije enzima iznad navedenih vrijednosti ne doprinosi povećanju stupnja hidrolize ukupnih ugljikohidrata ni značajnom smanjenju vremena hidrolize.
6. Provođenjem enzimskih hidroliza PKO kombinacijom 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyme blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L pri temperaturama od 20°C, 30°C i 40°C, u acetatnom puferu i MHP, maksimalan stupanj hidrolize ukupnih šećera od 100% dobiven je u MHP pri temperaturi 40°C, dok je pri istoj temperaturi stupanj hidrolize u acetatnom puferu iznosio 62,68%. Daljnje snižavanje temperature dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti enzima i samim time i stupnja hidrolize ukupnih šećera.
7. Sedam sojeva plijesni testirano je na lignocelulolitičku aktivnost i u svim ispitivanim sojevima otkrivena je određena razina hidrolitičke aktivnosti (tj. egzoglukanazne, endoglukanazne, ksilanazne, mananazne, arabinazne i pektinazne) potrebna za potpunu hidrolizu lignocelulozne sirovine. Najveću aktivnost i najširi spektar proizvedenih enzima među ispitivanim sojevima pokazale su plijesni iz roda *Fusarium*. Dodatna istraživanja pokazala su da oba ispitana soja plijesni roda *Fusarium* mogu koristiti za proizvodnju lignocelulolitičkih enzima. Veća glukanazna aktivnost otkrivena je u uzorcima supernatanta *F. oxysporum* JCM 9293 u usporedbi s *F. verticillioides* JCM 23107. Utvrđene maksimalne aktivnosti egzo- i endoglukanaze bile su 3,33 i 0,33 U mg⁻¹_{uk.proteina} postignute nakon 7 odnosno 4 dana uzgoja. Nasuprot tome, *F. verticillioides* JCM 23107 pokazao je dvostruko veću ksilanaznu aktivnost od *F. oxysporum* JCM 9293. Maksimalna aktivnost ksilanaze iz *F. verticillioides* JCM 23107 nakon 7 dana uzgoja bila je 16 U mg⁻¹_{uk. proteina}. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se oba soja plijesni mogu koristiti kao proizvođači enzimskih koktela.
8. Aeroban uzgoj kvasca *S. cerevisiae* Y9 i plijesni *M. indicus* DSM 2185 na kontrolnim podlogama s glukozom i/ili ksilozom pokazuje sposobnost kvasca da metabolizira ksilozu u prisutnosti glukoze, te da proizvodi etanol sa stupnjem konverzije supstrata u

etanol $0,20 \text{ g g}^{-1}$, dok je prilikom uzgoja u anaerobnim uvjetima stupanj konverzije iznosio $0,36 \text{ g g}^{-1}$, no u tim uvjetima kvasac izrazito sporo troši ksilozu prisutnu u podlozi. Plijesan *M. indicus* DSM 2185 pokazuje sposobnost konverzije ksiloze nakon utroška preferiranog izvora ugljika, glukoze. U ovim uvjetima je stupanj konverzije supstrata u etanol iznosio $0,38 \text{ g g}^{-1}$, dok je prilikom uzgoja u anaerobnim uvjetima stupanj konverzije iznosio $0,41 \text{ g g}^{-1}$. Plijesan u aerobnim uvjetima ujedno može koristiti i ksilozu kao jedini izvor ugljika te proizvoditi ksilitol, dok je u anaerobnim uvjetima potrošnja ksiloze zanemariva.

9. Plijesan *M. indicus* DSM 2185 ne može rasti u podlozi s glukozom u koju je kao jedini izvor dušika dodana sol, diamonijev sulfat ili diamonijev fosfat u koncentracijama od 1 do 10 g L^{-1} . Plijesan može rasti u podlozi s glukozom u koju je kao izvor dušika dodan pepton, mesni ekstrakt, kvašćev ekstrakt ili kukuruzna močevina (CSL) u koncentracijama od 1 do 10 g L^{-1} . Najveći prinosi produkata postignuti su u podlozi u koju je kao izvor dušika dodan CSL u koncentraciji 5 g L^{-1} odnosno 7 g L^{-1} te je proizveden etanol ($\approx 7,3 \text{ g L}^{-1}$), glicerol i dr. Prinos etanola i glicerola u podlozi u koje je kao izvor dušika dodan mesni ekstrakt postiže zadovoljavajuće prinose koji su oko 25% manji od prinosa određenih na glukozu i CSL-u kao izvoru dušika.
10. Uzgojem plijesni *M. indicus* DSM 2185 na BKHKO i DBKHKO uz dodatak kvašćevog ekstrakta i kukuruzne močevine maksimalan prinos etanola ($\approx 5,5 \text{ g L}^{-1}$) dobiven je nakon uzgoja u BKHKO uz dodatak 5 g L^{-1} odnosno 10 g L^{-1} CSL-a, dok su uzgojima na DBKHKO dobiveni nešto manji prinosi etanola ($\approx 4,5 \text{ g L}^{-1}$), no veći prinosi ksilitola ($\approx 2,0 \text{ g L}^{-1}$). Ujedno je primjećeno da plijesan može koristiti octenu kiselinu kao izvor ugljika.
11. Udio masnih kiselina u biomasi plijesni, dobivenoj nakon uzgoja na različitim izvorima dušika, kretao se u rasponu od 11,76% do 38,2% za pepton; od 21,76% do 35,82% za kvašćev ekstrakt; od 18,97% do 43,4% za CSL te od 0% do 31,1% za mesni ekstrakt. Ukupno su detektirane 22 masne kiseline, od kojih su najzastupljenije oleinska, palmitinska i linoleoidna i linolna kiselina.
12. Udio masnih kiselina u biomasi nakon uzgoja na BKHKO kretao se u rasponu od 31,11% do 39,17%, a nakon uzgoja na DBKHKO udio je između 30,25% i 40,25%. Ukupno su detektirane 22 masne kiseline, od kojih su najzastupljenije oleinska, linoleidna, palmitinska i linolna kiselina.

13. Na kontrolnoj i TOHP prethodno korištenima za uzgoj plijesni *M. indicus* DSM 2158 (BKHKO i BKHKO s 5 g L⁻¹ CSL-a) uspješno je proveden uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *R. adriaticum* DSM 2781, te je proizvedeno između 0,37 g L⁻¹ i 0,798 g L⁻¹ biomase; te od 3,70 do 60,12 mg g⁻¹ ukupnih pigmenata. Ujedno je nakon uzgoja na TOHP koja je prethodno sadržavala CSL detektirano i 1,02 g L⁻¹ izopropanola.
14. Kod simultane saharifikacije i fermentacije plijesni *M. indicus* DSM 2185 uz dodatak 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyne blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L u Erlenmayerovim tikvicama, najuspješniji bioproces u kojem je ostvarena produktivnost proizvodnje etanola 0,312 g L⁻¹ h⁻¹ vođen je na MHP pri 30°C, dok produktivnost procesa proizvodnje etanola u acetatnom puferu provedenom pri istim uvjetima iznosi 0.304 g L⁻¹ h⁻¹. Snižavanje i povećanje temperature procesa dovodi do znatnog smanjena produktivnosti proizvodnje etanola simultanom saharifikacijom i fermentacijom.
15. Tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom na BKHKO postignute su produktivnosti etanola od 0,143 g L⁻¹ h⁻¹, te 0,168 g L⁻¹ h⁻¹ ksilitola i 0,008 g L⁻¹ glicerola. Uzgojem u barbotirajućoj koloni postignute su produktivnosti od 0,052 g L⁻¹ h⁻¹ etanola, te 0,008 g L⁻¹ h⁻¹ ksilitola i 0,015 g L⁻¹ glicerola, dok su uzgojem u HRCB-u postignute produktivnosti od 0,029 g L⁻¹ h⁻¹ etanola, 0,013 g L⁻¹ h⁻¹ ksilitola i 0,003 g L⁻¹ glicerola. Maksimalan prinos biomase od 7,51 g L⁻¹ dobiven je u barbotirajućoj koloni, dok je najmanji prinos biomase od 3,32 g L⁻¹ dobiven u HRCB-u.
16. Tijekom uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom na E-PKO postignute su produktivnosti etanola od 0,222 g L⁻¹ h⁻¹ i 0,006 g L⁻¹ glicerola. Uzgojem u barbotirajućoj koloni postignute su produktivnosti od 0,270 g L⁻¹ h⁻¹ etanola i 0,028 g L⁻¹ glicerola, dok su uzgojem HRCB-u postignute produktivnosti od 0,110 g L⁻¹ h⁻¹ etanola, 0,001 g L⁻¹ h⁻¹ ksilitola i 0,007 g L⁻¹ glicerola. Maksimalan prinos biomase od 7,99 g L⁻¹ dobiven je u barbotirajućoj koloni, dok je najmanji prinos biomase od 3,83 g L⁻¹ dobiven u HRCB-u.
17. Na TOHP dobivenom nakon uzgoja plijesni *M. indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom uspješno je proveden uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *R. adriaticum* DSM 2781 u bioreaktoru s mješalom, te je proizvedeno 2,26 g L⁻¹ biomase i 14,62 mg g⁻¹ ukupnih pigmenata. Bakterija je proizvela i octenu kiselinu i izopropanol s produktivnostima od 0,034 g L⁻¹ h⁻¹ odnosno 0,065 g L⁻¹ h⁻¹.

18. Provođenjem procesa simultane saharifikacije i fermentacije plijesni *M. indicus* DSM 2185 u bioreaktoru s miješalom na podlozi koja je sadržavala PKO oklaske, CSL, pri temperaturi 30°C te uz dodatak 2% vol vol⁻¹ Cellulase, enzyne blend i 5,18% vol vol⁻¹ Viscozyme L, ostvarena je produktivnost etanola od 0,004 g L⁻¹ h⁻¹, dok se skraćivanjem trajanja procesa postiže produktivnost etanola 0,75 g L⁻¹ h⁻¹.
19. Kako bi se mogla provesti kontinuirana ekstrakcija etanola sa svim istraživanim otapalima (pentan-1-ol, oktan-1-ol, nonan-1-ol i oleil alkohol) uz udio etanola u rafinatu od 0,04 kg kg⁻¹ za ulazni tok podloge u ekstraktor od 1000 kg h⁻¹ koncentracije 0,063 kg kg⁻¹ etanola potrebni su sljedeći protoci otapala: najmanji protok otapala 450 kg h⁻¹ bio bi potreban za pentan-1-ol, 824 kg h⁻¹ za oktan-1-ol, 1000 kg h⁻¹ za nonan-1-ol i 2655 kg h⁻¹ za oleil alkohol.
20. Za izdvajanje ksilitola kristalizacijom iz vodene otopine i iz hidrolizata kukuruznih oklasaka korišteni su etanol, aceton i izopropanol. Najveće iskorištenje postupka kristalizacije ksilitola iz vodene otopine postignuto je uz upotrebu acetona i iznosi 30,95%, a iz hidrolizata otpadne trave uz upotrebu etanola i iznosi 17,87%.
21. Prinosi izoliranog hitina i hitozana iz plijesni *M. indicus* DSM 2185 uzgojene na hidrolizatu kukuruznih oklasaka varira između 0,14 g g⁻¹ i 0,30 g g⁻¹ hitina odnosno od 0,08 do 0,16 g g⁻¹ hitozana, dok su prinosi hitina i hitozana izoliranih iz biomase dobivene nakon uzgoja na enzimskom hidrolizatu predobrađenih kukuruznih oklasaka varirali od 0,15 g g⁻¹ do 0,22 g g⁻¹ hitina odnosno od 0,07 g g⁻¹ do 0,12 g g⁻¹ hitozana.
22. Materijalna bilanca pokazuje da je za proizvodnju 1 kg etanola potrebno 7,48 kg kukuruznih oklasaka i 150,36 L 0,5% m vol⁻¹ sumporne kiseline. Uz etanol, dobije se i 0,21 kg hitina, 0,14 kg hitozana, 0,18 kg masnih kiselina, 2,39 kg izopropanola i 1,27 kg octene kiseline.

7. LITERATURA

8. LITERATURA

Abbas, A., Wuyts, S., Lebeer, S., Vlaeminck, S.E. (2019) Volatile fatty acids impacting phototrophic growth kinetics of purple bacteria: Paving the way for protein production on fermented wastewater. *Water Res.* 152, 138–147.

Abdel-Hamid, A.M., Solbiati, J.O., Cann, I.K.O. (2013) Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 82, 1–28.

Abdullah, R., Nisar, K., Aslam, A., Iqtedar, M., Naz, S. (2015). Enhanced production of xylanase from locally isolated fungal strain using agro-industrial residues under solid-state fermentation. *Nat. Prod. Res.* 29(11), 1006–1011.

Abedinifar, S., Karimi, K., Khanahmadi, M., Taherzadeh, M. J. (2009). Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. *Biomass Bioenerg.* 33(5), 828–833.

Adapa, P., Tabil, L., Schoenau, G. (2009) Compaction characteristics of barley, canola, oat and wheat straw. *Byosys. Eng.* 104, 335–344.

Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* 29(6), 675–685.

Alriols, M. G., García, A., Llano-ponte, R., Labidi, J. (2010). Combined organosolv and ultrafiltration lignocellulosic biorefinery process. *Chem. Eng. J.* 157(1), 113–120

Althuri, A., Banerjee, R. (2019). Separate and simultaneous saccharification and fermentation of a pretreated mixture of lignocellulosic biomass for ethanol production. *Biofuels* 10(1), 61–72.

An, Q., Wu, X.-J., Han, M.-L., Cui, B.-K., He, S.-H., Dai, Y.-C., Si, J. (2016). Lignocellulolytic activity of white rot fungi. *BioResources*, 11(4), 8791–8805.

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

Arabi, M. I. E., Bakri, Y., Jawhar, M. (2011). Extracellular xylanase production by *Fusarium* species in solid state fermentation. *Pol. J. Microbiol.* 60, 209–2012.

Arce, A., Blanco, A., Souza, P., Vidal, I. (1994) Liquid-Liquid Equilibria of Water + Methanol + 1-Octanol and Water + Ethanol + 1-Octanol at Various Temperatures. *J. Chem. Eng. Data.* **39**, 378-380.

Arora, D. S., Gill, P. K. (2001). Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 28(7–8), 602–605.

Badwan, A.A., Rashid, I., Omari, M.M., Darras, F.H. (2015) Chitin and chitosan as direct compression excipients in pharmaceutical applications. *Mar. drugs.* 13(3); 1519-47.

Bajpai, P. (2016) Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels Production, Springer, Singapur.

Baker, L.G., Specht, C.A., Donlin, M.J., Lodge, J.K. (2007) Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell.* 6; 855-867.

Bakri, Y., Masson, M., Thonart, P. (2010). Isolation and identification of two new fungal strains for xylanase production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162(6).

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

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

Beg, Q.K., Mahajan, M.K.L, Hoondal, G.S. (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(3-4), 326–338.

Behera, S., Singh, R., Arora, R., Sharma N. K., Shukla, M., Kumar, S. (2015) Scope of algae as third generation biofuels. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2**, 90.

Beier, S., Bertilsson, S. (2013) Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. *Front. Microbiol.* 4; 149.

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

Bentil, J. A., Thygesen, A., Mensah, M., Lange, L., Meyer, A. S. (2018). Cellulase production by white-rot basidiomycetous fungi: solid-state versus submerged cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(14), 5827–5839.

Berka, R. M., Grigoriev, I. V., Otilar, R., Salamov, A., Grimwood, J., Reid, I., Ishmael, N., John, T., Darmond, C., Moisan, M. C., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Lombard, V., Natvig, D. O., Lindquist, E., Schmutz, J., Lucas, S., Harris, P., Powlowski, J., Tsang, A. (2011). Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nat. Biotechnol.*, 29(10), 922–929.

Bertolin, T. E., Schmidell, W., Maiorano, A. E., Casara, J., Costa, J. A. V. (2003). Influence of Carbon, Nitrogen and Phosphorous Sources on Glucoamylase Production by *Aspergillus awamori* in Solid State Fermentation. *Z. Naturforsch* 58.

Bianchi, L., De Philippis, R., Melis, A., Melnicki, M.R. (2008) Hydrogen production during stationary phase in purple photosynthetic bacteria. *Int. J. Hydrog. Energ* 33, 6525-6534.

Boguta, A. M., Bringel, F., Martinussen, J., Jensen, P. R. (2014). Screening of lactic acid bacteria for their potential as microbial cell factories for bioconversion of lignocellulosic feedstocks. *Microb. Cell Factories* 13(1).

Bozell, J.J. (2008). Feedstocks for the Future – Biorefinery Production of Chemicals from Renewable Carbon . *CLEAN – Soil, Air, Water* 36, 641–647.

Bradford, M. M. A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(0), 248–254.

Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., Rahmanpour, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 12(28), 1883–1896.

Bullard, G.L., Lathrop, J.R., McGarvey, J.A., Miller, W.G., Silva, C.J. (2009) Induction of purple sulfur bacterial growth in dairy wastewater lagoons by circulation. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 427-433.

Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* 56(3), 289-311

Candido, R. G., Godoy, G. G., Goncalves, A. G. (2012) Study of Sugarcane Bagasse Pretreatment With Sulfuric Acid As a Step of Cellulose Obtaining. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 61.

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. (2009) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37, 233–238.

Cao, W., Sun, C., Liu, R., Yin, R., Wu, X. (2012) Comparision of effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. *Bioresource Technol.* 111, 215-221.

Sasikala, C., Ramana, C.V. (1997) Biodegradation and Metabolism of Unusual Carbon Compounds by Anoxygenic Phototrophic Bacteria, *Adv. Microb. Physiol.* 39, 339-377.

Chandel, A. K., Antunes, F. A. F., de Arruda, P. V., Milessi, T. S. S., da Silva, S. S., de Almeida Felipe, M. D. G. (2012). Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: State-of-the-art. U D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Njemačka. 39–61.

Chandel, A. K., Chan, E. S., Rudravaram, R., Lakshmi Narasu, M., Venkateswar Rao, L., Ravindra, P. (2013) Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Afr. J. Environ. Econ. Manage.* 1 (5), 126 – 143.

Chen, H. (2014) Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice. Springer, London, 1-185.

Chen, H., Qiu, W. (2010) Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnol. Adv.* 28, 556-562.

Chen, M., Zhao, J., Xia, L. (2009). Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Biomass Bioenerg.* 33(10), 1381–1385.

Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Keshwani, D., Chen, C. (2007). Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142(3), 276–290.

Cherubini, F., Jungmeier, G., Wellisch, M., Willke, T., Skiadas, I., Van Ree, R., de Jong, E. (2009) Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Model. Anal.* 3, 534–546.

Colina, M., Vargas C., Alejandro J., Zerpa, M., Bianchi, V., Antonio, J., Monroy, R., Martínez Soto, C., Moisés, C. (2018). Evaluation of Industrial Processes to Obtain Chitin and Chitosan. U: "The Sixteen LACCEI International Multi-Conference for Engineering, Education and Technology "Innovation, Education, and Inclusion"", Srpanj 18 - 20, Lima (Perú).

Correa, D. F., Beyer, H. L., Fargione, J. E., Hill, J. D., Possingham, H. P., Thomas-Hall, S. R., Schenk, P. M. (2019) Towards the implementation of sustainable biofuel production systems. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **107**, 250 – 263.

da Silva Menezes, B., Rossi, D. M., Ayub, M. A. Z. (2017). Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33(3).

Dasgupta, D., Bandhu, S., Adhikari, D. K., Ghosh, D. (2017) Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: a review. *Microbiol. Res.* 197, 9-21.

Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., Qin, W. (2010) Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol.* 1(1), 36–50.

de Albuquerque, T., Jose da Silva Jr, I., Ribeiro de Macedo, G., Valderez Ponte Rocha, M., (2014) Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. *Process Biochem.* 49(11), 1779-1789.

de Faveri, D., Torre, P., Perego, P., Converti, A. (2004). Optimization of xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions using response surface methodology. *J. Food Eng.* 61(3), 407–412.

de la Torre, I., Ladero, M., Santos, V. E. (2018). Production of *d*-lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* from orange peel waste: techno-economical assessment of nitrogen sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(24), 10511–10521.

de Oliveira, R. A., Gottschalk, L. M. F., Freitas, S. P., Bon, E. P. da S. (2018). One-vessel saccharification and fermentation of pretreated sugarcane bagasse using a helical impeller bioreactor. *Biomass Convers. Biorefin.* 8(1), 1–10

Djiroleu, A., Carrier, D. J. (2016). Effects of Dilute Acid Pretreatment Parameters on Sugar Production during Biochemical Conversion of Switchgrass Using a Full Factorial Design. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4(8), 4124–4130.

deb Dutta, S., Tarafder, M., Islam, R., Datta, B. (2018). Characterization of cellulolytic enzymes of *Fusarium* soil Isolates. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 14, 279–285.

DZS 2018: Statistički ljetopis Republike Hrvatske 2018, Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, Zagreb.

Elegbede, J. A., Lateef, A. (2018). Valorization of Corn-Cob by Fungal Isolates for Production of Xylanase in Submerged and Solid State Fermentation Media and Potential Biotechnological Applications. *Waste Biomass Valorization* 9(8), 1273–1287.

Florencio, C., Couri, S., Farinas, C. S. (2012) Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Res.* 2012, 1-7.

Fortes Gottschalk, L. M., de Sousa Paredes, R., Sposina, R., Teixeira, S., Sant', A., da Silva, A., Pinto Da, E., Bon, S. (2013). Efficient production of lignocellulolytic enzymes xylanase, β -xylosidase, ferulic acid esterase and β -glucosidase by the mutant strain *Aspergillus awamori* 2B.361 U2/1. *Braz. J. Microbiol.* 44(2), 569-76.

Foston, M., Ragauskas, A. J. (2010) Changes in lignocellulosic supramolecular and ultrastructure during dilute acid pretreatment of Populus and switchgrass. *Biomass Bioenerg.* 34(12), 1885–1895.

Galbe, M., Zacchi, G. (2007) Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 108, 41-65.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) 59(2), 257–268.

Gooday, G.W. (1990) The Ecology of Chitin Degradation. *Adv. Microb. Ecol.* 387-430.

Goswami, G. K., Rawat, S. (2015) Microbial xylanase and their applications - A review. *Int. J. Curr. Res. Acad. Rev.* 3, 436-450.

Gulati, H. K., Chadha, B. S., i Saini, H. S. (2007). Production of Feed Enzymes (Phytase and Plant Cell Wall Hydrolyzing Enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: Purification and Characterization of Phytase. *Folia Microbiol.* 52(5), 491-7.

Haidle, C. W., Storck, R. (1966) Control of Dimorphism in *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol.* 92, 1236–1244.

Hajji, S., Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M. (2014) Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *Int. J. Biol. Macromol.* 65; 298-306.

Halada, P., Leitner, C., Sedmera, P., Haltrich, D., Volc, J. (2003). Identification of the covalent flavin adenine dinucleotide-binding region in pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor*. *Anal. Bioch.* 314(2), 235–242.

Harmsen, P. F. H., Lips, S. J. J., Bakker, R. R. C. (2013). Pretreatment of lignocellulose for biotechnological production of lactic acid: research review. Wageningen UR Food i Biobased Research, Wageningen, Rapport 1384.

Heidary Vinche, M., Khanahmadi, M., Ataei, S. A., i Danafar, F. (2021). Optimization of process variables for production of β -glucanase by *Aspergillus niger* CCUG33991 in Solid-State Fermentation using wheat bran. *Waste Biomass Valori.* 12(6), 3233–3243.

Herrera Bravo de Laguna, I., Toledo Marante, F. J., Mioso, R. (2015) Enzymes and bioproducts produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. *J. Appl. Microbiol.* 119(6), 1455–1466.

Higuchi – Takeuchi, M., Numata, K. (2019) Marine Purple Photosynthetic Bacteria as Sustainable Microbial Production Hosts. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 258.

Higuchi-Takeuchi, M., Morisaki, K., Toyooka, K., Numata, K. (2016) Synthesis of high-molecular-weight polyhydroxyalkanoates by marine photosynthetic purple bacteria. *PLOS ONE* 11(8), e0160981.

Hiraishi A., Ueda Y. (1994) Intrageneric Structure of the Genus *Rhodobacter*: Transfer of *Rhodobacter sulfidophilus* and related marine species to the genus *Rhodovulum* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(1) 15 – 23.

Hiraishi A., Ueda Y. (1995) Isolation and characterization of *Rhodovulum strictum* sp. nov. and some other purple nonsulfur bacteria from colored blooms in tidal and seawater pools. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(2) 319 – 326.

Holm-Nielsen, J. B., Ehimen, E. A. (2014) Biorefinery plant design, engineering and process optimisation. U: Advances in biorefineries, (Waldron, K. ured.), Woodhead Publishing, Sawston, UK, 89-111.

Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, R. L., Howars, S. (2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzymba production. *Afr. J. Biotechnol.* 12, 602-619.

IEA Bioenergy (2020) IEA Bioenergy Annual Report 2020, International Energy Agency, Pariz. <<https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2021/04/IEAB-Annual-Report-2020.pdf>>Pristupljeno 1. prosinca 2021.

Imhoff, J. F. (2006) The Phototrophic α -proteobacteria. U: The Prokaryotes, vol. 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, (Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E., ured.), Springer, New York, 41-64.

Imhoff, J. F., Trüper, H. G. (1989) The purple non sulfur bacteria. *Man. System. Bacteriol.* 3, 1658-1661.

Intasit, R., Cheirsilp, B., Suyotha, W., Boonsawang, P. (2021). Synergistic production of highly active enzymatic cocktails from lignocellulosic palm wastes by sequential solid state-submerged fermentation and co-cultivation of different filamentous fungi. *Biochem. Eng. J.* 173, 108086.

Isikgor, H. F., Becer. C. R. (2015) Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Polym. Chem-UK.* 6, 4497-4559.

Islam, S.Z., Khan, M., Nowsad Alam, A.K.M. (2016) Production of chitin from shrimp shell wastes. *J. Bangladesh Agril. Univ.* 14(2); 253-259.

Ivančić Šantek, M., Miškulin, E., Beluhan, S., Šantek, B. (2016) Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva. *Kem. Ind.* 65, 25-38.

Ivančić Šantek, M., Zvonar, I., Beluhan, S., i Šantek, B. (2018) Proizvodnja bioetanola iz kukuruznih oklasaka. *Kem. Ind.* 67(7–8), 297–308.

Janda, K., Kristoufek, L., Zilberman, D. (2012) Biofuels: policies and impacts. *Agric. Econ. – Czech* **58**, 372 – 386.

Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdarska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., i Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 41(6), 941–962.

Jeennor, S., Laoteng, K., Tanticharoen, M., Cheevadhanarak, S. (2006) Comparative fatty acid profiling of *Mucor rouxii* under different stress conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 259, 60-66.

Jeennor, S., Laoteng, K., Tanticharoen, M., Cheevadhanarak, S. (2008) Evaluation of inoculum performance for enhancing gamma-linolenic acid production from *Mucor rouxii*. *Lett. Appl. Microbiol.* 46(4), 421-427.

Jonsson, L. J., Martin, C. (2015) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource. Tehnol.* 199, 103-112.

Kachlishvili, E., Penninckx, M. J., Tsiklauri, N., i Elisashvili, V. (2006). Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22(4), 391–397.

Kang, Q., Appels, L., Tan, T., i Dewil, R. (2014). Bioethanol from lignocellulosic biomass: Current findings determine research priorities. *Sci. World J.* 2014, 1-13.

Kapoor, M., Panwar, D., i Kaira, G. S. (2016). Bioprocesses for Enzyme Production Using Agro-Industrial Wastes: Technical Challenges and Commercialization Potential. U Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass (Dhillon, G., Kaur, S. ured), Elsevier Inc., Amsterdam, Nizozemska, 61–93.

Karimi, K., Chisti, Y. (2015) Future of Bioethanol.... *Biofuel Res. J.* 5, 147.

Karimi, K., Emtiazi, G., Taherzadeh, M. J. (2006) Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochem.* 41, 653-658.

Karimi, K., Zamani, A. (2013). *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. *Biotechnol. Adv.* 31(4), 466–481.

Khan, T. S., Mubeen, U. (2012). Wheat Straw: A Pragmatic Overview. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 4(6), 673–675.

Kharina, M., Loginova, I., Petukhova, E., i Meshcheryakova, M. N. (2020). Dilute sulfurous acid pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of corn cobs. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, 421(5), 1-7.

Kirbaslar, I., Cehreli, S., Ustun, D., Keskinocak, E. (2000) Equilibrium data on ethanol-watersolvent ternaries. *Braz. J. Chem. Eng.* 17, 1-8.

Knob, A., Fortkamp, D., Prolo, T., Izidoro, S. C., Almeida, J. M. (2014). Agro-residues as Alternative for Xylanase Production by Filamentous Fungi. *BioRes.* 9(3), 5738–5773.

Koh, P. L., Ghazoul, J. (2008) Biofuels, biodiversity and people: Understanding the conflict and finding opportunities. *Biol. Conserv.* 141, 2450-2460.

Köhl, J., Lombaers, C., Moretti, A., Bandyopadhyay, R., Somma, S., Kastelein, P. (2015). Analysis of microbial taxonomical groups present in maize stalks suppressive to colonization by toxigenic *Fusarium* spp.: A strategy for the identification of potential antagonists. *Biol. Control* 83, 20–28.

Kostylev, M., Wilson, D. (2012) Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. *Biofuels* 3(1), 61-70.

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

Kumar, M. (2000) A review of chitin and chitosan applications. Elsevier BV, Amsterdam, Nizozemska.

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

Kupiainen, L., Ahola, J., Tanskanen, J. (2012) Hydrolysis of organosolv wheat pulp in formic acid at high temperature for glucose production. *Biores. Technol.* 116, 29-35.

Lee, D., Owens, V.N., Boe, A., Jeranyma, P. (2007) Composition of herbaceous biomass feedstocks. North Central Sun Grant Center, Brookings, 5-12.

Lenardon, M., Munro, C.A., Gow, N.A.R. (2010) Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 13; 416-423.

Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill, E., Ahmad, M. N. M., Rooney, D. W., Walker, G. M. (2010) Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chem. Eng. J.* 156(2), 395–403.

Lennartsson P. R., Karimi, K., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2009) Effects of different growth forms of *Mucor indicus* on cultivation on dilute-acid lignocellulosic hydrolyzate, inhibitor tolerance, and cell wall composition. *J. Biotechnol.* 143(4), 255–261.

Lennartsson, P. R., Ylittervo, P., Larsson, C., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2012). Growth tolerance of *Zygomycetes Mucor indicus* in orange peel hydrolysate without detoxification. *Process Biochem.* 47(5), 836–842.

Limayem, A., Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38(4), 449–467.

Liu, Q., Luo, L., Zheng, L. (2018) Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 19(2), 335.

Liu, S., Zhang, G., Li, X., Zhang, J. (2014) Microbial production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 7349–7357.

Liu, Z., Wang, D. (2018). Necessary and Specialty Construction of Resource Recycling Science and Engineering in Industrial and Mining Universities. Proceedings of the 8th International Conference on Social Network, Communication and Education (SNCE 2018) 425–428.

Lloyd, T. A., Wyman, C. E. (2005). Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Biores. Technol.* 96(18) 1967–1977.

Lopes, D. D., Rosa, C. A., Hector, R. E., Dien, B. S., Mertens, J. A., Ayub, M. A. Z. (2017). Influence of genetic background of engineered xylose-fermenting industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44(11), 1575–1588.

Lúcia Garcia Simões, M., Tauk-Tornisielo, M. S., Tapia Tapia, M. D. (2009). Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. *Afr. J. Biotechnol.* 8(22), 6317–6326.

Ljungdahl, L.G. (2008) The cellulase/hemicellulase system of the anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and aspects of its applied use. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 308–321

Ma, S., Preims, M., Piumi, F., Kappel, L., Seiboth, B., Record, E., Kracher, D., Ludwig, R. (2017). Molecular and catalytic properties of fungal extracellular cellobiose dehydrogenase produced in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Microb. Cell Factories* 16(1), 1–14.

Majeti, N. V., Kumar, R. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 46, 1-27.

Malherbe, S., Cloete, T.E. (2002) Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotech.* 1(2), 105–114.

Mardetko, N., Novak, M., Trontel, A., Grubišić, M., Galić, M., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre-treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 32 (4), 483–499.

Margaritis, A., Merchant, R. F. (1986). Optimization of fermentation conditions for thermostable cellulase production by *Thielavia terrestris*. *J. Ind. Microbiol.* 1(3), 149-156.

Martin, K., McDougall, B. M., McIlroy, S., Jayus, Chen, J., Seviour, R. J. (2007). Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)- and β -(1,6)-glucanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 31(2), 168–192.

Martinez, E. C., de Silva, J. B. de A., Giulietti, M., Nápoles Solenzal, A. I. (2007) Downstream process for xylitol produced from fermented hydrolysate. *Enzyme Microb Technol.* 40, 1193-1198.

Matrawy, A. A., Khalil, A. I., Marey, H. S., Embaby, A. M. (2021). Use of wheat straw for value-added product xylanase by *Penicillium chrysogenum* strain a3 DSM 105774. *J. Fungi*, 7(9), 696.

McCromick, R. L. (2016) High Octane Fuels: Benefits and Challenges, NREL, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Co.

<https://cleancities.energy.gov/files/u/news_events/document/document_url/158/CC_HOF_Webinar_Combined.pdf> pristupljeno 15.prosinca 2021.

McIntosh, S., Palmer, J., Zhang, Z., Doherty, W. O. S., Yazdani, S. S., Sukumaran, R. K., Vancov, T. (2017) Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated *Eucalyptus grandis* under high solids loading. *Ind. Biotechnol.* **13**, 131 – 139.

Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M. K., Upadhyay, R. S. (2017). Antagonistic assessment of *Trichoderma* spp. by producing volatile and non-volatile compounds against different fungal pathogens. *Arch of Phytopathol Plant Protection* 50(13–14), 629–648.

Meng, Q., Zhang, Y., Ju, X., Ma, C., Ma, H., Chen, J., Zheng, P., Sun, J., Zhu, J., Ma, Y., Zhao, X., Chen, T. (2016) Production of 5-aminolevulinic acid by cell free multi-enzyme catalysis. *J. Biotechnol.* 226, 8-13.

Merugu, R., Prashanthi, Y., Sarojini, T., Badgu, N. (2014) Bioremediation of waste waters by the anoxygenic photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* SMR 009. *Int. J. Res. Environ. Sci. Technol.* 4, 16-19.

Merzendorfer, H., Zimoch, L. (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206(24); 4393-412.

Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2005) Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor* and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolyzates. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 294-300.

Millati, R., Karimi, K., Edebo, L., Niklasson, C., Taherzadeh, M. J. (2008) Ethanol production from xylose and wood hydrolyzate by *Mucor indicus* at different aeration rates.. *BioRes.* 3(4), 1020–1029.

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31(3), 426–428

Ming-Tsung Yen, J-H., Jeng-Leun Mau, Y. (2009) Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydr. Polym.* 75(1), 15-21.

Morales, M., Quiintero, J., Conejeros, R., Aroca, G. (2014) Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Enviromental impact and energy balance. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 42, 1349-1361.

More, S. S., Renuka, P. S., Pruthvi, K., Swetha, M., Malini, S., Veena, S. M. (2011). Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme Res.* 2011(1), 1–8.

Morikawa Y., Zhao X., Liu D. (2014) Biological co-production of ethanol and biodiesel from wheat straw: a case of dilute acid pretreatment. *Royal Society of Chemistry Adv.* 4: 37878-37887.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biores. Technol.* 96, 673-686.

Mourtzinis, S., Cantrell, K. B., Arriaga, F. J., Balkcom, K. S., Novak, J. M., Frederick, J. R., Karlen, D. L. (2016). Carbohydrate and nutrient composition of corn stover from three southeastern USA locations. *Biomass Bioenerg.* 85, 153–158.

Mousdale, D. M. (2008) *Biofuels: Biotechnology, Chemistry and Sustainable Development*, Taylor i Francis, London, UK.

Nagadomi, H., Takahashi, K., Sasaki, K., Yang, H.C. (2000) Simultaneous removal of chemical oxygen demand and aerobic treatment of sea water using an immobilised phototynthetic bacterium of porous ceramic plates. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 57-62.

Nait M’barek, H., Taidi, B., Smaoui, T., Aziz, M. ben, Mansouri, A., Hajjaj, H. (2019). BASE Isolation, screening and identification of ligno-cellulolytic fungi from northern central Morocco. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 23(4), 207-217.

Neureiter, M., Danner, H., Frühauf, S., Kromus, S., Thomasser, C., Braun, R., Narodoslowsky, M. (2004). Dilute acid hydrolysis of presscakes from silage and grass to recover hemicellulose-derived sugars. *Biores. Technol.* 92(1), 21–29.

Neutzling O., Imhoff J. F., Trüper H. G. (1984) *Rhodopseudomonas adriatica* sp. nov., a new species of the *Rhodospirillaceae*, dependent on reduced sulfur compounds. *Arch. Microbiol.* 137, 256 – 261.

Nguyen, L. M. (2000) Organic matter composition, microbial biomass and microbial activity in gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters. *Ecol. Eng.* 16, 199–221.

Nishikawa, S., Watanabe, K., Tanaka, T., Miyachi, N., Hotta, Y., Murooka, Y. (1999) *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark conditions. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 798-804.

Novak, M., Trontel, A., Marđetko, N., Matoković, V., Sarić, M., Pavlečić, M., Šantek, M. (2017) Photoheterotrophic cultivation of purple non-sulphur bacterium *Rhodovulum adriaticum* on the media with different carbon sources. *Cro. J. Food Technol. Biotechnol. Nutrit.* 15, 115-123.

Nunkaew, T., Kantachote, D., Kanzaki, H., Nitoda, T., Ritchie, R.J. (2014) Effects of 5-ALA containing supernatants from selected *Rhodospseudomonas palustris* strains on rice growth under NaCl stress, with mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes. *Electron. J. Biotechnol.* 17, 19-26.

Offeman, R. D., Stephenson, S. K., Robertson, G. H., Orts, W. J. (2005). Solvent extraction of ethanol from aqueous solutions. I. Screening methodology for solvents. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44(17), 6789–6796.

OGel, Z. B., Yarangümeli, K., Dündar, H., Ifrij, I. (2001) Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. *Enzyme Microb. Technol.* 28(7-8), 689-695.

Okamoto, K., Uchii, A., Kanawaku, R., Yanase, H. (2014). Bioconversion of xylose, hexoses and biomass to ethanol by a new isolate of the white rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *SpringerPlus* 3, 1–9.

Olafsson, K., Bertilsson, M., Liden, G. (2008) A short review on SSF- an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol. Biofuels.* 1, 1-14.

Ospina Alvarez, S.P., Ramirez Cadavid, D.A., Escobar Sierra, D.M., Ossa Orozco, C.P., Rojas Vahos, D.F., Zapata Ocampo, P. (2014) Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture. *BioMed Res. Int.* 2014; 169071.

Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25-33.

Palonen, H. (2004) Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose, ESPOO 2004, VTT Technical Research Centre Of Finland, Finska.

Palumbo, J. D., O'keeffe, T. L., Abbas, H. K. (2008). Microbial interactions with mycotoxigenic fungi and mycotoxins. *Tox. Rev.* 27(42067), 261–285.

Pan, X., Kadla, J.F., Ehara, K., Gilkes, N., Saddler, J.N. (2006) Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *J. Agric. Food. Chem.* 54, 5806–5813.

Papagianni, M. (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv.* 22(3):189-259.

Papinutti, L., Lechner, B. (2008). Influence of the carbon source on the growth and lignocellulolytic enzyme production by *Morchella esculenta* strains. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35(12), 1715–1721.

Parajó, J.C., Domínguez, H., Domínguez, J.M., (1998) Biotechnological production of xylitol. Part3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Biores. Technol.* 66, 25-40.

Pečiulytė, D. (2007). Isolation of cellulolytic fungi from waste paper gradual recycling materials. *Ekologija* 53(4), 11-18.

Perez-Pimienta, J.A., Lopez-Ortega, M.G., Varanasi, P. (2013) Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass. *Biores. Technol.* 127, 18–24.

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

Pointner, M., Kuttner, P., Obrlik, T., Jäger, A., Kahr, H. (2014) Composition of corn cobs as a substrate for fermentation of biofuels. *Agronom. Res.* 12(2), 391-396.

Pordesimo, L. O., Hames, B. R., Sokhansanj, S., Edens, W. C. (2005). Variation in corn stover composition and energy content with crop maturity. *Biomass Bioenerg.* 28(4), 366–374.

Puls, J. (1997) Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromol. Symp.* 120, 183-196.

Raafat, D., Sahl, H.G. (2009) Chitosan and its antimicrobial potential- A critical literature survey. *Microbial. Biotechnol.* 2(2), 186-201.

Rafiqul, I. S., Mimi Sakinah, A. M., (2013) Processes for the Production of Xylitol- A review. *Food Rev. Int.* 29, 127-156.

Rahman, M. A., Rahman, M. S., Nabi, M. N. (2001) Extraction of ethanol from aqueous solution by solvent extraction-liquid-liquid equilibrium of ethanol-water-1-butanol, ethanolwater-1-pentanol and ethanol-water-1-hexanol systems. *Indian. J. Chem. Technol.* 8, 385-389.

Rass-Hansen, J., Falsig, H., Jorgensen, B., Christensen, C. H. (2007) Perspective Bioethanol: fuel or feedstock. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 329-333.

Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochemie* 86(11), 807–815.

Ravalason, H., Grisel, S., Chevret, D., Favel, A., Berrin, J. G., Sigoillot, J. C., Herpoël-Gimbert, I. (2012). *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance saccharification of wheat straw. *Biores. Technol.* 114, 589–596.

Redding, A. P., Wang, Z., Keshwani, D. R., Cheng, J. J. (2011). High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. *Biores. Technol.* 102(2), 1415–1424.

Renewable Fuels Association (2019) < <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production> > pristupljeno 20. prosinca 2021.

Rezić, T., Ivančić Šantek, M., Andlar, M., Pavlečić, M., Šantek, B. (2016) Usporedba različitih tehnika proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina. *Croat. J. Food Techn. Biotechnol. Nutr.* 11, 6–17.

Rinaudo, M. (2007) Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Poly. Internat.* 57(3), 397-430.

Ritchie, R. J. (2018) Measurement of Chlorophylls *a* and *b* and Bacteriochlorophyll *a* in Organisms From Hypereutrophic Auxinic Waters. *J. Appl. Phycol.* 30(6), 3075–3087.

Robert Tabita, F., Rubis, C.O.A., Alternative Assimilatory Routes, I. v, Blankenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E. (1995). The Biochemistry and Metabolic Regulation of

Carbon Metabolism and CO₂ Fixation in Purple Bacteria. U: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria (Blankenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E. ured.), Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, 885–914.

Ruan, R., Zhang, Y., Chen, P., Liu, S., Fan, L., Zhou, N., Ding, K., Peng, P., Addy, M., Cheng, Y., Anderson, E., Wang, Y., Liu, Y., Lei, H., Li, B. (2019) Biofuels: Introduction. U: Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels. 2. izdanje (Pandey, A., Larroche, C., Dussap, C.G., Gnansounou, E., Khanal, S. K., Ricke, S.) Elsevier Inc., Amsterdam, 3 – 43.

Rudolf, C., Grammel H. (2012) Fructose metabolism of the purple non-sulfur bacterium *Rhodospirillum rubrum*: Effect of carbon dioxide on growth, and production of bacteriochlorophyll and organic acids. *Enzyme Microb. Technol.* 50, 238-246.

Saha B. C., Nichols N. N., Qureshi N., Cotta M. A. (2013) Comparison of Separate Hydrolysis and Fermentation versus Simultaneous Saccharification and Fermentation of Pretreated Wheat Straw to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biobased Mat. Bioenerg.* 7, 409-414.

Saha, B. C. (2001). Xylanase from a newly isolated *Fusarium verticillioides* capable of utilizing corn fiber xylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(5–6), 762–766.

Saha, B. C. (2004) Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. U: Lignocellulose biodegradation (Saha B. C., Hayashi K., ured.), ACS Symposium Series; American Chemical Society, Washington DC, 2–34.

Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., Wu, Y. V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochem.* 40(12), 3693–3700.

Sahare, P., Singh, R., Laxman, R. S., Rao, M. (2012). Effect of Alkali Pretreatment on the Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Corn Cob. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168(7), 1806–1819.

Saini, M. L., Jain, P., Joshi, U. N. (2007). Morphological characteristics and nutritive value of some grass species in an arid ecosystem. *Grass For. Sci.* 62(1), 104-108.

Samuel, R., Pu, Y., Foston, M., Ragauskas, A.J. (2010) Solid-state NMR characterization of switchgrass cellulose after dilute acid pretreatment. *Biofuels.* 1(1), 85–90.

Sanchez, O. J., Cordona C. A. (2007) Trends in biotechnological production of ethanol from different feedstocks. *Biores. Technol.* 99, 5271-5295.

Saroj, P., Manasa, P., Narasimhulu, K. (2018). Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. *Biores. and Bioprocess.* 5(1), 31.

Satari, B., Karimi, K., Zamani, A. (2015) Oil, chitosan, and ethanol production by dimorphic fungus *Mucor indicus* from different lignocelluloses. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91(6), 1835-1843.

Satimanont, S., Luengnaruemitchai, A., Wongkasemjit, S. (2012a). Effect of Temperature. *Int. J. Chem. Biol. Eng.* 6, 333–337.

Sawayama, S., Tsukahara, K., Yagishita, T. (1999) Wastewater treatment and poly- β -hydroxybutyrate production using lighted upflow anaerobic sludge blanket method. *J. Biosci. Bioeng.* 5, 683-689.

Schneider, W. D. H., Gonçalves, T. A., Uchima, C. A., Reis, L. dos, Fontana, R. C., Squina, F. M., Dillon, A. J. P., Camassola, M. (2018). Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium echinulatum* strains and its hydrolysis potential for lignocellulosic biomass. *Process Biochem.* 66, 162–170.

Seader, J. D., Henley, E. J., Roper, D. K. (2011). Separation Process Principles - Chemical and Biochemical Operations (3. edition). John Wiley & Sons, Inc. .

Shafiei Alavijeh, R., Karimi, K., van den Berg, C. (2020). An integrated and optimized process for cleaner production of ethanol and biodiesel from corn stover by *Mucor indicus*. *J. Cleaner Prod.* 249.

Sharifia, M. (2007) Production of ethanol by different morphology of *Mucor indicus*, MSc Thesis, Department of Chemical Engineering. Isfahan University of Technology, Iran.

Sharifyazd, S., Karimi, K. (2017). Effects of fermentation conditions on valuable products of ethanolic fungus *Mucor indicus*. *Electron J Biotechnol.* 30, 77–82.

Sharma, N., Sharma, N. (2018) Microbial xylanases and their industrial applications as well as future perspectives: a review. *Global J. Biol. Agric. Health Sci.* 6, 5-12.

Shu, C. H., Xu, C. J., Lin, E. S. (2006). Production, purification and partial characterization of a novel endo- β -1,3-glucanase from *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochem.* 41(5), 1229–1233.

Sigoillot, J.C., Berrin, J.G., Bey, M., Lesage-Meessen, L., Levasseur, A., Lomascolo, A., Record, E., Uzan-Boukhris, E. (2012) Fungal Strategies for Lignin Degradation. U Advances in Botanical Research, (Lapierre, C., Jouanin, L. ured), Elsevier, Amsterdam, 263-308.

Silva, S. S., Felipe, M. G. A., Mancilha, I. M., (1998) Factors that Affect the Biosynthesis of Xylitol by Xylose-Fermenting Yeasts. A Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70-72, 331-339.

Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. (2016) Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Biores. Technol.* 199, 76–82.

Singh nee Nigam, P., Pandey, A. (2009) Biotechnology for agro-industrial residues utilisation. Springer Science+Business Media, Berlin – Heidelberg, 2-16.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. (2012) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure (LAB). NREL technical report.

Somashekar, D., Venkateshwaran, G., Sambaiah, K., Lokesh, B. R. (2003) Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. *Process Biochem.* 38, 1719-1724.

Sues, A., Millati, R., Edebo, L., Taherzadeh, M. J. (2005). Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Res.* 5(6–7), 669–676.

Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* 83, 1-11.

Sun, Y., Cheng, J. J. (2005). Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technol.* 96(14), 1599–1606.

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.J., Keikhosro, K. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 9(9), 1621-1651.

Takaaki Finn, Akiko Nakazawa, Naoki Sumi, Hiroaki Tani, Akikazu Ando i Minoru Yabuki (1983) Utilization of Alcohols by *Rhodopseudomonas* sp. No. 7 Isolated from n-Propanol–Enrichment Cultures. *Agric. Biol. Chem.* 47(12), 2747-2753.

Templeton, D. W., Sluiter, A. D., Hayward, T. K., Hames, B. R., Thomas, S. R. (2009). Assessing corn stover composition and sources of variability via NIRS. *Cellulose* 16(4), 621–639.

Turner, D., Xu, H., Cracknell, R. F., Natarajan, V., Chen, X. (2011) Combustion performance of bio-ethanol at various blend ratios in a gasoline direct injection engine. *Fuel* 90, 1999-2006.

van der Pol, E. C., Vaessen, E., Weusthuis, R. A., Eggink, G. (2016). Identifying inhibitory effects of lignocellulosic by-products on growth of lactic acid producing micro-organisms using a rapid small-scale screening method. *Biores. Technol.* 209, 297–304.

van Eylen, D., van Dongen, F., Kabel, M., de Bont, J. (2011). Corn fiber, cobs and stover: Enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment. *Biores. Technol.* 102(10), 5995–6004.

Van Wychen, S., Laurens, L. M. L. (2013) Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by in situ transesterification. Laboratory Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, SAD.

Varga, E., Réczey, K., Zacchi, G. (2004). Steam Pretreatment of Corn Stover 509 Optimization of Steam Pretreatment of Corn Stover to Enhance Enzymatic Digestibility. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 114, 509-523.

Vasiliadou, I.A., Berná, A., Manchon, C., Melero, J.A., Martinez, F., Esteve-Nuñez, A., Puyol, D. (2018) Biological and Bioelectrochemical Systems for Hydrogen Production and Carbon Fixation Using Purple Phototrophic Bacteria. *Front. Energy Res.* (objavljeno online 13. studenog 2018.).

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

Vertès, A. A., Quresji, N., i Hodge, D. B. (2017). Processes for Liquid Biofuels Biorefineries Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels. U: Biorefineries (Qureshi, N., Hodge, D. B., Vertes, A. A. ured.). Elsevier, Amsterdam, Nizozemska.

Wang, F., Ai, M., Yang, G., Chen, J., Chen, X., Huang, F. (2016). Extracellular lignases. *BioRes.* 11(3), 5676-5686.

Wang, G. S., Lee, J. W., Zhu, J. Y., Jeffries, T. W. (2011). Dilute acid pretreatment of corncob for efficient sugar production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163(5), 658–668.

Wang, L., Yang, M., Fan, X., Zhu, X., Xu, T., Yuan, Q. (2011). An environmentally friendly and efficient method for xylitol bioconversion with high-temperature-steaming corncob hydrolysate by adapted *Candida tropicalis*. *Process Biochem.* 46(8), 1619–1626.

Wang, S., Li, Q. S., Li, Z., Su, M. G. (2007). Solubility of xylitol in ethanol, acetone, N,N-dimethylformamide, 1-butanol, 1-pentanol, toluene, 2-propanol, and water. *J. Chem. Eng. Data* 52(1), 186–188.

Wei, J., Yuan, Q., Wang, T., Wang, L. (2010). Purification and crystallization of xylitol from fermentation broth of corncob hydrolysates. *Front. Chem. Eng. China* 4(1), 57–64.

Weiss, N. D., Farmer, J. D., Schell, D. J. (2010). Impact of corn stover composition on hemicellulose conversion during dilute acid pretreatment and enzymatic cellulose digestibility of the pretreated solids. *Biores. Technol.* 101(2), 674–678.

Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J., Saddler, J. N. (2004). Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and β -Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrates. *Appl. Bioch. Biotechnol.* 115, 1115-1126.

Xiu-yan, L., Xiang-yang, X., Qing-lan, M., Wei-hong, W. (2005) Biological formation of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *J. Environ. Sci.* 7, 152-155.

Yan, G., Viraraghavan, T. (2003) Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Res.* 37(18), 4486–4496.

Yang, B., Dai, Z., Ding, S. Y., Wyman, C. E. (2011). Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels* 2(4), 421–449.

Yang, B., Wyman, C. E. (2008). Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 2(1), 26–40).

Yang, S. Q., Yan, Q. J., Jiang, Z. Q., Li, L. T., Tian, H. M., Wang, Y. Z. (2006). High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Biores. Technol.* 97(15), 1794–1800.

Yang, S., Qiaojuan, Y., Jiang, Z., Fan, G., Wang, L. (2008). Biochemical characterization of a novel thermostable β -1,3-1,4- glucanase (Lichenase) from *Paecilomyces thermophila*. *J. Agric. Food Chem.* 56(13), 5345–5351.

Yang, T.L. (2011) Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ. *Int. J. Mol. Sci.* 12(3); 1936-63.

Yuksel, F., Yuksel, B. (2004) The use of ethanol-gasoline blend as a fuel in an SI engine. *Renew. Energ.* 29, 1181-1191.

Zagrag, V., Asghari, M., Dashti, A. (2015) A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivates, and applications. *Chem. Bio. Eng. Rev.* 2(3), 204-226.

Zamani, A., Jeihanipour, A., Edebo, L., Niklasson, C., Taherzadeh, M. J. (2008) Determination of glucosamine and N-acetyl glucosamine in fungal cell wall. *J. Agric. Food Chem.* 56, 8314-8.

Zhang, L., Liu, Y., Niu, X., Liu, Y., Liao, W. (2012) Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by production by *Trichoderma resei* Rut C-30 and corresponding enzymatic hydrolysis. *Biomass. Bioener.* 37, 16-24.

Zhang, Y., Wang, L., Chen, H. (2017). Correlations of medium physical properties and process performance in solid-state fermentation. *Chem. Eng. Sci.* 165, 65–73.

Zhao, H., Jones, C.L., Baker, G.A., Xia, S., Olubajo, O., Person, V.N. (2009) Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J. Biotechnol.* 139(1), 47–54.

Zhi-Guo, Z., Hong-Zhang, C. (2012) Enhancement of the enzymatic hydrolysis of wheat straw by pretreatment with 1-allyl-3-methylimidazolium chloride ([Amim]Cl). *Afr. J. Biotechnol.* 11(31), 8032–8037.

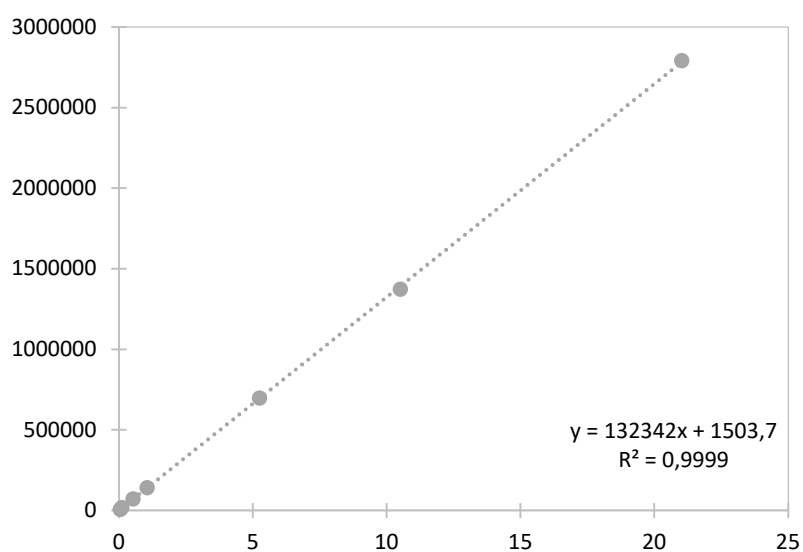
Zhu, Y., Lee, Y. Y., Elander, R. T. (2005). Optimization of Dilute-Acid Pretreatment of Corn Stover Using a High-Solids Percolation Reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 124, 1045-1054.

Zynch, D. (2008.) The Viability Of Corn Cobs As A Bioenergy Feedstock. West Central. Research and Outreach Center, University of Minnesota, Minneapolis, USA.

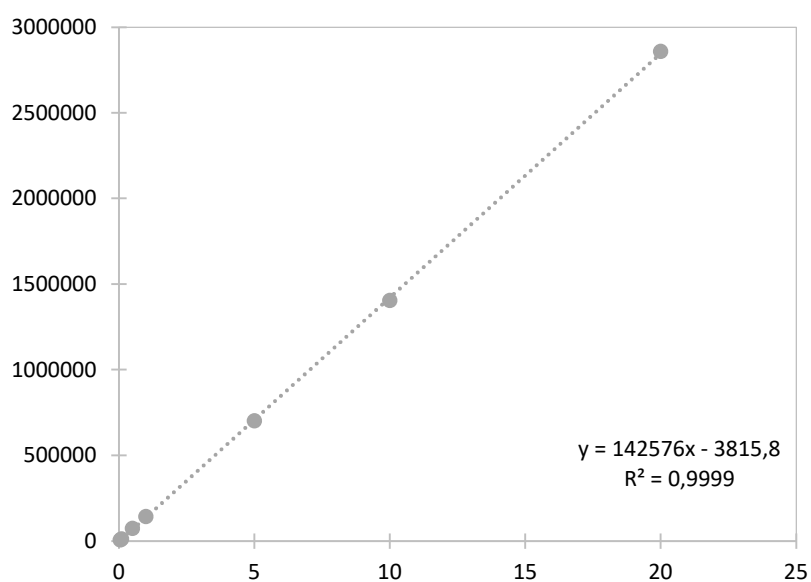
8. PRILOZI

8. PRILOZI

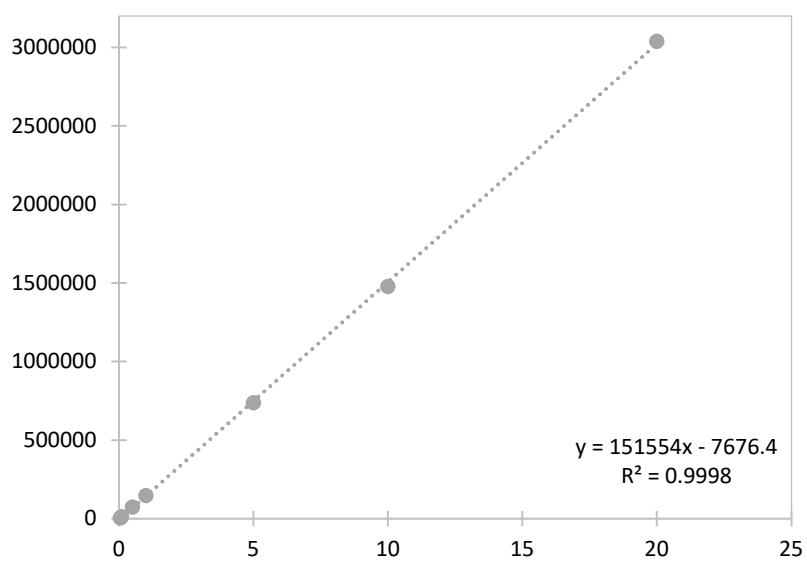
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze UPLC-om



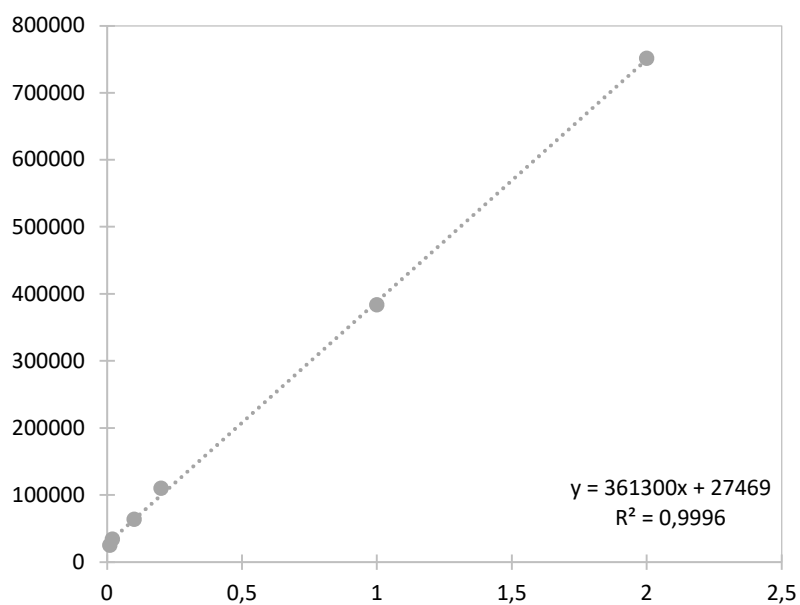
Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ksiloze UPLC-om



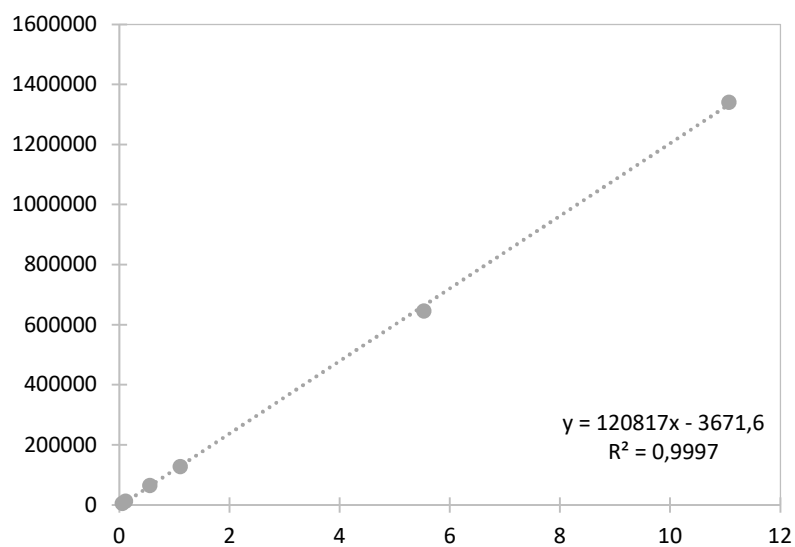
Prilog.3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije arabinoze UPLC-om



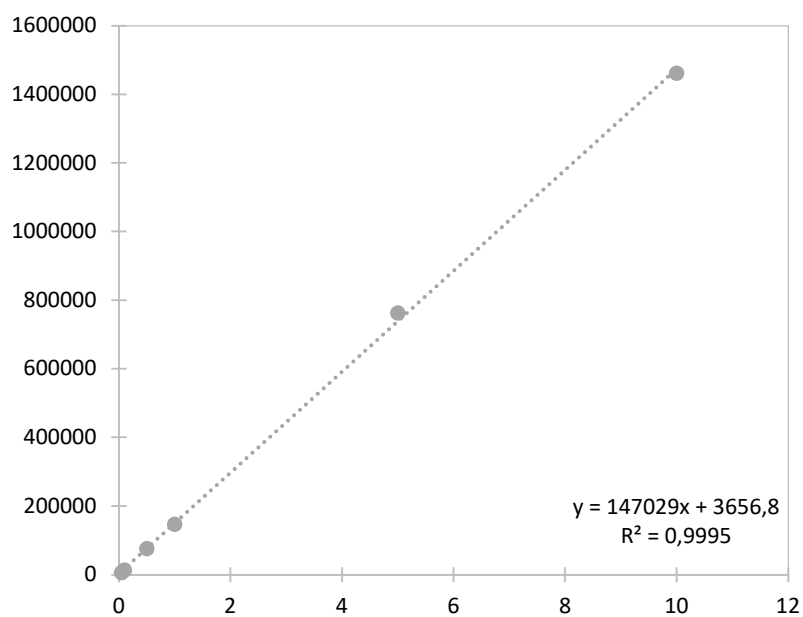
Prilog 4. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije etanola UPLC-om



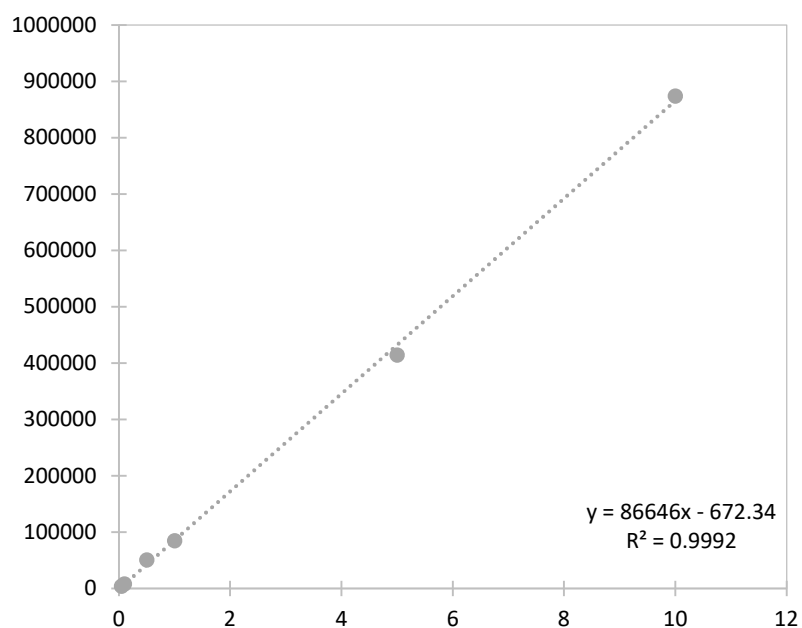
Prilog 5. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glicerola UPLC-om



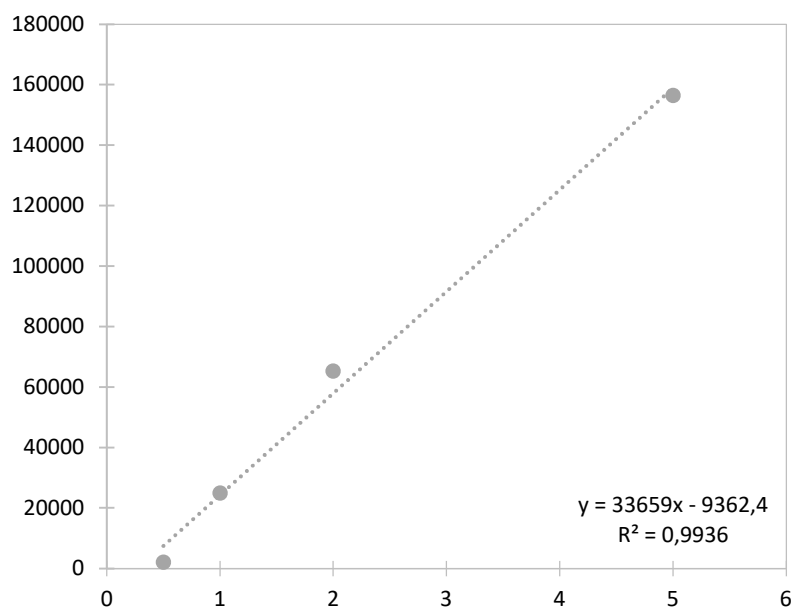
Prilog 6. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije ksilitola UPLC-om



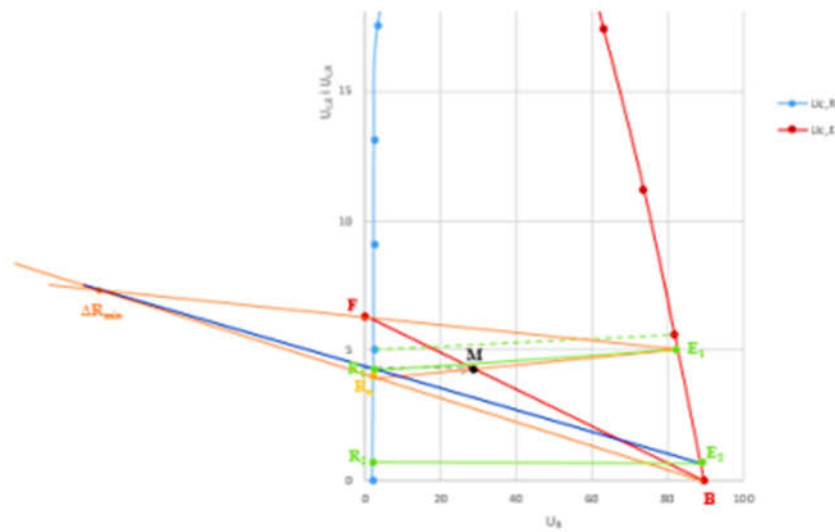
Prilog 7. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije octene kiseline UPLC-om



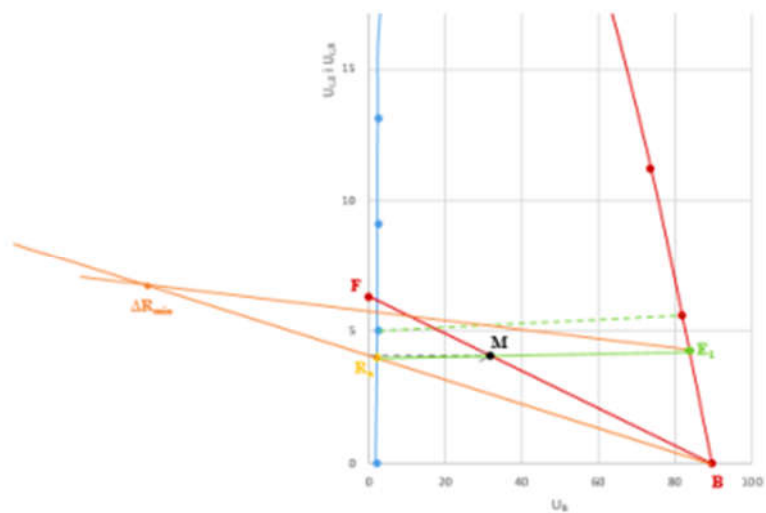
Prilog 8. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije izopropanola UPLC-om



Prilog 9. Primjer grafičkog određivanja broja potrebnih stupnjeva za kontinuiranu ekstrakciju etanola pentan-1-olom.



Prilog 10. Primjer grafičkog određivanja potrebnog protoka za jednostupanjsku ekstrakciju etanola s pentan-1-olom.



Popis kratica:

A – aerobno

AN – anaerobno

BKHKO – blago kiseli hidrolizat kukuruznih oklasaka

CMC – karboksimetil celuloza

CSL – kukuruzna močevina

DBKHKO – dekolorizirani blago kiseli hidrolizat kukuruznih oklasaka

E-PKO – enzimski hidrolizat predobrađenih kukuruznih oklasaka

HMF – hidroksimetilfurfural

HRCB – horizontalni rotirajući cijevni bioreaktor

KE – kvašćev ekstrakt

LiP – lignin peroksidaza

ME – mesni ekstrakt

MHP – matrična hranjiva podloga

MnP – mangan peroksidaza

PE – pepton

PKO – predobrađeni kukuruzni oklasci

SBKHKO – sirovi blago kiseli hidrolizat kukuruznih oklasaka

SHF – odvojena enzimska hidroliza i fermentacija

SSF – simultana saharifikacija i fermentacija

TOHP – tekući ostatak hranjive podloge

VP – svestrana peroksidaza

9. ŽIVOTOPIS

Nenad Marđetko rođen je 5. rujna 1990. godine u Čakovcu. Godine 2009. upisao je Prehrambeno-biotehnološki fakultet gdje je završio diplomski studij bioprocenog inženjerstva. Od 2016. godine radi kao asistent na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, a također je upisao i poslijediplomski doktorski studij biotehnologija i bioproceno inženjerstvo. Glavni interesi njegovih znanstvenih istraživanja su različite metode predobrade lignoceluloznih sirovina, proizvodnja bioetanola i drugih biokemikalija korištenjem obnovljivih sirovina, održivom razvoju bioprocena, vođenje procesa u bioreaktorima, uzgoji na čvrstim i polu-čvrstim supstratima. Član je istraživačke skupine na projektu „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina (HRZZ IP-2018-01-9717)”, voditelj projekta prof.dr.sc Božidar Šantek, i na europskom projektu „Bioprospecting Jadranskog mora“ (KK.01.1.1.01), a sudjelovao je i na projektu „Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-IP-2013-11-9158) i sudjelovao je u razmjeni u sklopu europskog projekta PHOENIX (ESEA-H2020-MSCA-RISE-2015).

Objavljeni znanstveni radovi:

A1

Didak Ljubas, B., Novak, M., Trontel, A., Rajković, A., Kelemen, Z., **Marđetko, N.**, Grubišić, M., Pavlečić, M., Petravić Tominac, V., Šantek, B. (2022) Production of Different Biochemicals by *Paenibacillus polymyxa* DSM 742 From Pretreated Brewers' Spent Grains. *Frontiers in Microbiology*, 13, 812457, 16.

Pavlečić, M., Novak, M., Trontel, A., **Marđetko, N.**, Grubišić, M., Ljubas, B., Tominac, V., Rakovac, R., Šantek, B. (2022) Mathematical Modelling of Bioethanol Production from Raw Sugar Beet Cossettes in a Horizontal Rotating Tubular Bioreactor. *Fermentation*, 8(1), 13, 14.

Marđetko, N., Trontel, A., Novak, M., Pavlečić, M., Didak Ljubas, B., Grubišić, M., Petravić Tominac, V., Ludwig, R. i Šantek, B. (2021) Screening of Lignocellulolytic Enzyme Activities in Fungal Species and Sequential Solid-State and Submerged Cultivation for the Production of Enzyme Cocktails. *Polymers*, 13 (3736), 3736, 16

Žunar, B., Trontel, A., Svetec Miklenić, M., Prah, J., Štafa, A., Marđetko, N., Novak, M., Šantek, B., Svetec, I. (2020) Metabolically engineered *Lactobacillus gasseri* JCM 1131 as

a novel producer of optically pure L- and D-lactate. *World journal of microbiology i biotechnology*, 36 (8), 111, 16.

Bušić, A., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., **Mardetko, N.**, Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., Šantek, B. (2018) Recent Trends in Biodiesel and Biogas Production. *Food technology and biotechnology*, 56 (2), 152-173.

Mardetko, N., Novak, M., Trontel, A., Grubišić, M., Galić, M., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre- treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 32 (4).

Andlar, M., Rezić, T., **Mardetko, N.**, Kracher, D., Ludwig, R. i Šantek, B. (2018) Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in life sciences*, 1, 1-11.

Bušić, A., **Mardetko, N.**, Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food technology and biotechnology*, 56 (3), 289-311.

A2

Novak, M., Trontel, A., **Mardetko, N.**, Pavlečić, M., Matoković, V., Sarić, M. i Šantek, B. (2020) Fotoheterotrofni uzgoj ljubičaste nesumporne bakterije *Rhodovulum adriaticum* na hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 15 (3-4), 115-123.

Znanstveni skupovi:

Mario, Novak; Mladen, Pavlečić; **Nenad, Mardetko**; Antonija, Trontel; Manda, Madaras; Marko, Sarić; Božidar, Šantek (2020) Kinetic analysis of purple non-sulphur bacteria *Rhodovulum adriaticum* DSM 2781 growth on carbon sources from lignocellulosic hydrolysates. 5th Conference “Microbial Stress: From Systems to Molecules and Back”

Održan online: European federation of biotechnology, str. 60-60.

Trontel, Antonija; Novak, Mario; Pavlečić, Mladen; **Mardetko, Nenad**; Mrak, Karla; Lončar, Anamarija; Šantek, Božidar (2020) Selection of non-Saccharomyces yeast with tolerance to high lactic acid concentrations for production of biochemicals, “Microbial Stress: From Systems to Molecules and Back” Održan online: European federation of biotechnology, str. 61-61.

Mardetko, Nenad; Trontel, Antonija; Novak, Mario; Šantek, Božidar (2019) Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic biomass hydrolysates . Power of Microbes in Industry and Environment, Book of Abstracts (Slavica, Anita ; Teparić, Renata, Leboš Pavunc, Andreja, Kifer, Domagoj (ur.)) Zagreb: Croatian Microbiological Society, 2019. str. 94-94

Novak, Mario; Harutyunyan, Baghish; Trontel, Antonija; **Mardetko, Nenad**; Pavlečić, Mladen; Šantek, Božidar (2018) Photosynthetic purple non-sulphur bacteria as a potential 5-aminolevulinic acid producers. Book of Abstracts - 9th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists (Kovačević-Ganić, Karin ; Dragović-Uzelac, Verica ; Balbino, Sandra (ur.)) Zagreb: Croatian Society of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists,. str. 56-56

Trontel, Antonija; Vidović, Petra; Novak, Mario; **Mardetko, Nenad**; Šantek, Božidar (2018)

Dilute alkali pre-treatment of wheat straw in high-pressure reactor. Book of Abstracts - 9th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists (Kovačević-Ganić, Karin ; Dragović-Uzelac, Verica ; Balbino, Sandra (ur.)) Zagreb: Croatian Society of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, str. 55-55.

Mardetko, Nenad; Novak, Mario; Trontel, Antonija; Grubišić, Marina; Galić, Maja; Šantek, Božidar (2017) Kinetic analysis of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* cultivated on wheat straw hydrolysates. European summit of industrial biotechnology 2017 Graz: acib GmbH, 2017. str. 173-173

Tečajevi i radionice:

XVIII. International Chromatography School, 14-15 06.2018, Zagreb, Hrvatska

eseia International Summer School 2017, „Balancing of bio-resources and energy production“, 26.6.-1.7. 2017, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Dubrovnik, Hrvatska.

Pilot Plant Course-Research Lab on Organic-waste exploitation, 18-20. 10.2017, :metabolon, Lindlar-Remshagen, Njemačka