

Istraživanje primjene gljiva bijelog truljenja za razgradnju lignina i celuloze u piljevinama hrasta kitnjaka, bukve i cera

Nađ, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:305399>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Helena Nađ

Istraživanje primjene gljiva bijelog truljenja za razgradnju lignina i
celuloze u piljevinama hrasta kitnjaka, bukve i cera

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Kemijski i biokemijski reaktori
Tema rada je prihvaćena na XI. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28. rujna 2012.
Mentor: dr. sc. *Marina Tišma*, doc.

Istraživanje primjene gljiva bijelog truljenja za razgradnju lignina i celuloze u piljevinama hrasta kitnjaka, bukve i

Helena Nađ, 92/DI

Sažetak:

Lignocelulozni otpad je široko rasprostranjen materijal i predstavlja potencijalnu sirovinu za proizvodnju goriva i drugih visokovrijednih proizvoda. Moguće ga je biološki obrađivati uz pomoć mikroorganizama koji imaju sposobnost sinteze ekstracelularnih enzima odgovornih za razgradnju lignoceluloznih sastavnica biljaka. Mikroorganizmi koji se najčešće upotrebljavaju u tu svrhu su gljive bijelog truljenja. U ovom radu su gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* i *Phanerochaete chrysosporium* uzgajane u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na piljevinama drveta bukve (*Fagus sylvatica*), hrasta kitnjaka (*Quercus petraea*) i cera (*Quercus cerris*) u laboratorijskim staklenkama, te na repinim rezancima u laboratorijskim staklenkama i u bioreaktoru. Pokusi su provedeni pri 27 °C, 45 dana. Određivani su udjeli lignina i celuloze na početku i na kraju procesa fermentacije. Istraživan je utjecaj veličine pora sinter lončića i utjecaj dva načina provođenja kiselinske hidrolize na udio lignina u uzorcima. U svim pokusima došlo je do razgradnje lignina i pokazano je da odabir sinter lončića i važnost načina provedbe hidrolize tijekom određivanja udjela lignina ima veliki utjecaj na konačni rezultat.

Ključne riječi: Lignin, celuloza, repini rezanci, piljevine drveta, *T. versicolor*, *P. chrysosporium*

Rad sadrži: Slika: 9
Stranica: 53
Tablica : 12
Literarnih referenci: 38

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--|---------------|
| 1. doc. dr. sc. <i>Natalija Velić</i> | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. <i>Marina Tišma</i> | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Mirela Planinić</i> | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Ana Bucić Kojić</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 11. srpnja 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of thermodynamics and reaction engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Chemical and biochemical reactors
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. XI. held on September 28, 2012..
Mentor: Marina Tišma, PhD, assistant prof.

Research on white rot fungi application for the degradation of lignin and cellulose in sessile oak, beech and oak sawdusts

Helena Nađ, 92/DI

Summary:

Lignocellulose waste is an abundant material and presents potentially valuable raw material for the production of fuels and other high-value products. It can be biologically treated by microorganisms that are able to produce extracellular enzymes responsible for degradation of plants' lignocellulosic components. White-rot fungi are the most often used microorganisms for that purpose. In this work, white-rot fungi *Trametes vesicolor* and *Phanerochaete cryosporium* were cultivated in solid-state fermentation on beech (*Fagus sylvatica*), sessile oak (*Quercus petraea*) and oak (*Quercus cerris*) sawdusts in laboratory jars, and on sugar beet waste in jars and bioreactor. Experiments were performed at 27 °C, 45 days. Lignin and cellulose content were measured at the beginning and at the end of the process. The influence of crucible pore size and two different methods of hydrolysis on lignin content were investigated. In all experiments lignin degradation occurred and it was shown that the influence of filter pores and the hydrolysis process have impact on samples lignin content.

Key words: Lignin, cellulose, sugar industry waste, wood sawdust, *T. vesicolor*, *P. cryosporium*

Thesis contains: Figures: 9
Pages: 53
Tables: 12
References: 38

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Natalija Velić, PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Marina Tišma, PhD, assistant prof. | supervisor |
| 3. Mirela Planinić, PhD, associate prof. | member |
| 4. Ana Bucić Kojić, PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: July 11, 2014.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Marina Tišma, doc., na trudu, strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem i dr. sc. Nataliji Velić, doc., i dr. sc. Mireli Planinić, izv. prof., na susretljivosti i stručnim savjetima kojima su uvelike pomogli pri izradi ovog rada.

Hvala svim kolegicama na njihovom prijateljstvu i pomoći tijekom studija.

Posebno hvala mojim divnim roditeljima i sestrama koji su me podržavali i bili mi neprestani oslonac tijekom cijelog studija.

Na kraju bih željela reći jedno veliko hvala svome suprugu Igoru, na njegovoj beskonačnoj strpljivosti, razumijevanju i ogromnoj potpori koju mi pružao cijelo ovo vrijeme.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. LIGNOCELULOZNA BIOMASA KAO SIROVINA ZA VISOKOVRIJEDNE BIOTEHNOLOŠKE PRODUKTE	4
2.1.1. Celuloza	4
2.1.2. Hemiceluloza	5
2.1.3. Lignin	6
2.1.3.1. Metode izolacije lignina iz lignoceluloznih materijala	9
2.2. LIGNOCELULOZNI OTPAD	12
2.2.1. Drvo kao sirovina	12
2.2.2. Repini rezanci kao sirovina	15
2.3. GLJIVE	15
2.3.1. Općenito o gljivama	15
2.3.2. Klasifikacija	16
2.3.3. Gljive bijelog truljenja	17
2.3.4.1. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	17
2.3.4.2. <i>Trametes versicolor</i>	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. ZADATAK	20
3.2. MATERIJALI	20
3.2.1. Lignocelulozni materijali	20
3.2.2. Kemikalije	21
3.3. APARATURA	21

3.3.1. Vodena kupelj.....	21
3.3.2. Centrifuga.....	21
3.3.3. Vakuum sušionik	21
3.3.4. Autoklav.....	21
3.3.5. Sušionik.....	21
3.4. METODE.....	22
3.4.1. Određivanje suhe tvari termogravimetrijskom metodom.....	22
3.4.2. Određivanje kiselinski netopivog Klason-ovog lignina.....	22
3.4.3. Određivanje udjela celuloze u lignoceluloznim materijalima	24
4.REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. UDIO LIGNINA U LIGNOCELULOZNIM SIROVINAMA.....	27
4.2. USPOREDBA SINTER LONČICA RAZLIČITOG POROZITETA	32
4.3. USPOREDBA POSTUPKA HIDROLIZE	34
4.4. USPOREDBA POSTUPKA FERMENTACIJE U AEROBNOM BIOREAKTORU I LABORATORIJSKOJ STAKLENCI	35
4.5. UDIO CELULOZE U LIGNOCELULOZNIM SIROVINAMA	36
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. POPIS LITERATURE	42

Popis oznaka, kratica i simbola

H_2SO_4	Sumporna kiselina
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Kalijev dikromat
CH_3COOH	Octena kiselina
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Etanol
HNO_3	Dužična kiselina
NaCl	Natrijev klorid
C_6H_6	Benzen
HCl	Klorovodična kiselina
TOC	Ukupan organski ugljik
DMS	Dimetilsulfid
DMSO	Dimetilsulfoksid
BTX	Smjesa benzena, toluena i izomera ksilena
MWL	(eng. Milled wood lignin) Mljeveni drvni lignin
CEL	(eng. Cellulolytic enzyme lignin) Celulolitički enzimski lignin
EMAL	(eng. Enzymatic mild acidolysis lignin) Enzimski blago acidolizni lignin

1. UVOD

Stručnjaci Europskog energetskeg portala su na svojim internetskim stranicama objavili uznemirujuću procjenu vijeka trajanja neobnovljivih izvora energije. Izračunato je da će nafte nestati točno 2047. godine, prirodnog plina 2068. godine, a zalihe ugljena će trajati do 2140. godine. Najdulji vijek će imati uran koji će se iscrpiti do 2144. godine. Čovječanstvo se, nesumnjivo, mora odviknuti od ovisnosti o fosilnim gorivima i okrenuti se energiji iz obnovljivih izvora. Stoga se posljednjih godina sve više radi na proizvodnji tekućih i plinskih biogoriva. Tekuća biogoriva, koja su trenutno u komercijalnoj uporabi proizvedena su uglavnom od prehrambenog bilja, pa se tako bioetanol najčešće proizvodi od različitih žitarica (kukuruz), šećerne repe i šećerne trske, a biodizel iz različitih biljnih ulja i životinjskih masti. Međutim, veliki nedostatak predstavlja što su te biljke vrijedne i kao ljudska i kao životinjska hrana pa im je cijena na svjetskom tržištu promjenjiva i nepredvidiva jer ovisi o godišnjem urodu. Pristaše obnovljivih biogoriva vide bioetanol proizveden iz lignoceluloznih sirovina kao vrstu biogoriva koja ima najveći potencijal u budućnosti za pružanje energije iz obnovljivih izvora (Vertes, 2010.).

Lignoceluloznih sirovina ima u izobilju i svake godine se akumuliraju u velikim količinama, te osim što uzrokuju onečišćenje okoliša, predstavljaju i gubitke potencijalno vrijedne sirovine. Biološkom razgradnjom lignoceluloznog otpada, problem njegovog akumuliranja bio bi riješen, a ujedno bi došlo do proizvodnje visoko cijenjenog proizvoda - bioetanola. Proizvodnja bioetanola iz polisaharidnih sirovina je složenija u odnosu na šećerne sirovine, jer je potrebno najprije hidrolizirati polisaharide do jednostavnih šećera, kako bi se mogla provesti alkoholna fermentacija. Hidrolizu lignoceluloznih sirovina sprječava lignin, koji omeđuje celulozu, stoga ga je potrebno najprije ukloniti. Neki mikroorganizmi posjeduju sposobnost razgradnje lignina, a najučinkovitijima su se pokazale gljive bijelog truljenja.

Svrha ovog diplomskog rada bila je odrediti udjele lignina i celuloze u različitim lignoceluloznim materijalima, piljevini drveta cera (*Quercus cerris*), hrasta kitnjaka (*Quercus petraea*) i bukve (*Fagus sylvatica*), te u otpadnim repinim rezancima zaostalim nakon procesa proizvodnje konzumnog šećera, prije i nakon njihove biološke obrade s gljivama bijelog truljenja *T. versicolor* i *P. chrysosporium*. U radu su korištene modificirane gravimetrijske metode COST FP0901 s ciljem pronalaska utjecaja veličine pora sinter lončića i načina provođenja hidrolize polimera na ukupan udio lignina u uzorcima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIGNOCELULOZNA BIOMASA KAO SIROVINA ZA VISOKOVRIJEDNE BIOTEHNOLOŠKE PRODUKTE

Lignocelulozna biomasa obuhvaća šumarski, poljoprivredni i agro-industrijski otpad, kojeg ima u izobilju, te je obnovljiv i jeftin izvor energije. Taj otpad uključuje različite materijale kao što su piljevine, drvo topole, biomasa šećerne trske, otpadni papir, pivski trop, trava i slama, lišće, ljuske, školjke i stabljike od žitarica poput riže, pšenice, kukuruza, ječma, sirka i slično (Mussato i sur., 2010). Lignocelulozni otpad se svake godine akumulira u velikim količinama, te osim što uzrokuje onečišćenje okoliša, predstavlja i gubitke potencijalno vrijedne sirovine.

Lignocelulozna struktura se uglavnom sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina, polimera koji su međusobno povezani.

Celuloza je vjerojatno najvažnija komponenta u lignoceluloznoj biomasi, koja se sastoji od dugačkih lanaca glukoze različite strukturalne konfiguracije. Upravo strukturalne karakteristike i obavijenost celuloze i hemiceluloze ligninom, čine lignocelulozni materijal otpornim za hidrolizu. Lignin je visoko razgranata molekula (Juhász i sur., 2005.) te smanjuje enzimatsku razgradljivost lignocelulozne biomase. Zbog toga, konverzija lignocelulozne biomase u etanol zahtijeva prethodnu obradu kako bi se razgradila lignocelulozna struktura, uklonio lignin, te hidrolizirali celulozni i hemicelulozni dijelovi do njihovih sastavnih monosaharida (Saha, 2003.). Za prethodnu obradu se mogu koristiti sljedeći postupci:

1. Mehanički (mljevenje, sjeckanje);
2. Fizički (djelovanje topline, tlaka i zračenja);
3. Kemijski (djelovanje lužina, kiselina i sredstava za ekstrakciju);
4. Kombinacija mehaničkih i fizičko-kemijskih postupaka;
5. Biološki, tj. enzimski postupci (ligninaze, hemicelulaze) (Marić, 2000.)

Glavni nedostatak prva četiri postupka je visoka cijena i upravo zbog toga se zadnjih godina sve više istražuju enzimski postupci, budući da se oni provode pri blagim uvjetima temperature i tlaka, bez upotrebe velikih količina skupih i toksičnih kemijskih sredstava.

2.1.1. Celuloza

Celuloza je glavni sastojak drva i biljnih vlakana (Marić, 2000.), te je kao takva najvažnija prirodna tvar koju proizvode živi organizmi (Antonović, 2008.). Izgrađena je od jedinica

D-glukoze spojenih glikozidnim β -(1,4) vezama koje tvore molekularni lanac. Dugi lanci celuloze poredani su u snopove učvršćene vodikovim mostovima između brojnih OH-skupina. Snopovi su međusobno ispleteni i tvore vlakna (Marić, 2000.). Formula celuloze je $(C_6H_{10}O_5)_n$.

Celuloza je netopljiva u vodi i organskim otapalima, te se celulozna vlakna s tehničkog gledišta odlikuju i znatnom mehaničkom čvrstoćom. Ljudski organizam ne može metabolizirati celulozu, dok životinje biljojedi u svom probavnom traktu sadrže bakterije koje luče enzim celulazu odgovornu za razgradnju celuloze. Danas se često celulozne otpatke prerađuje mikrobnim procesima u etanol i proteinska krmiva. Mogući izvori celuloze za mikrobne procese jesu:

- otpaci crnogoričnog i bjelogoričnog drva (piljevina, kora, strugotine),
- poljoprivredni otpaci (slama, pljeva, komušina, kukuruzna stabljika, lišće) (Marić, 2000.).

Celuloza je važan izvor ugljika za proizvodnju mnogih biotehnoloških proizvoda, međutim postupak hidrolize lignoceluloznih sirovina potrebno je unaprijediti, što uključuje razdvajanje celuloze od lignina i njezinu daljnju hidrolizu.

2.1.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza je povezujuća komponenta između celuloze i lignina (Bon, 1996.). Po strukturi je sličnija celulozi nego ligninu (Ramos, 2003.). Lanac molekule je mnogo kraći nego u slučaju celuloze, te imaju bočne grupe i u nekim slučajevima su razgranate (Antonović, 2008.). Tipično je sastavljen od pet različitih šećera L-arabinoze, D-galaktoze, D-glukoze, D-manoze i D-ksiloze (Mussatto, 2010.) i šećernih kiselina. C_5 i C_6 šećeri su međusobno povezani pomoću 1,3, 1,6 i 1,4 glikozidnih veza i s acetilnim grupama, tvoreći labavu i hidrofilnu strukturu, koja djeluje poput ljepila između celuloze i lignina (Bon i Ferrara, 1996.).

Može se hidrolizirati u mono- i oligo- saharide kiselinama, lužinama i enzimima. Mogući je zanimljiv izvor ugljika za mikrobne procese, ako se, i kada, nađe postupak učinkovitije hidrolize ili se genetičkim inženjerstvom konstruira mikroorganizme za njezinu izravnu primjenu (Marić, 2000.).

2.1.3. Lignin

Lignini su amorfne trodimenzionalne mreže polimera fenilpropanskih jedinica s mnogo različitih kemijskih veza između monomera koji dovode do složene strukture koja se može objasniti samo učestalošću i rasprostranjenosti različitih veza (Antonović, 2008). Više od dvije trećine fenilpropanskih jedinica u ligninu su vezane ugljik-kisik (eterskim) vezama, dok su ostale ugljik-ugljik veze.

Lignin je netopljiv u vodi i visoko otporan na kemijsku i biološku degradaciju. Smješten je u biljnoj središnjoj lameli, ponašajući se poput cementa između stanica, te je ugrađen u staničnim stjenkama, gdje zajedno s hemicelulozom tvori amorfni matriks u koji su ugrađena celulozna vlakna (Bon i Ferrara, 1996). U aromatskom prstenu i bočnom lancu propana prisutni su različiti tipovi funkcionalnih grupa, koji utječu na svojstva i reaktivnost lignina. Te veze rezultiraju povećanom nepropusnosti, mehaničkom čvrstoćom i krutosti biljne stanične stijenke; također stanicama daje odličnu otpornost na mikrobne napade (Lange i sur., 2013.). Izgradnja makromolekula lignina biljaka uključuje složene biološke, biokemijske i kemijske sisteme koji se intenzivno istražuju. Brojne studije s radioaktivnim ugljikom (^{14}C) potvrdile su *p*-kumarilni, koniferilni i sinapilni alkohol kao osnovne građevne jedinice lignina (Antonović, 2008.).

Prema navedenim osnovnim građevnim jedinicama, lignini se općenito mogu podijeliti u tri velike grupe:

- **gvajacilni lignini (G lignini)** - dio su skoro svih četinjača, uglavnom sadrže gvajacilpropanske jedinice, a u velikom dijelu su polimerizacijski produkti koniferilnog alkohola;
- **gvajacil-siringilni lignini (G-S lignini)** - tipični su za listače, uglavnom su sastavljeni od gvajacil- i siringilpropanskih jedinica, te nastaju kao kopolimeri koniferilnog i sinapilnog alkohola uz mali udio *p*-hidroksifenilnih jedinica, u omjeru koji varira između 4:1 do 1:2 za dvije monomerne jedinice.
- ***p*-hidroksifenil-gvajacil-siringilni lignini (H-G-S lignini)** - tipični su za ostale vrste lignoceluloznih biljaka, a sastavljeni su od *p*-hidroksifenil-, gvajacil- i siringilpropanskih jedinica u molarnom omjeru koji je ovisan o prirodi biljne vrste (Antonović, 2008.).

Stvaranje makromolekule lignina iz fenilpropanskih jedinica može se općenito opisati kao dehidrogenativna polimerizacija. Lignin se biosintetizira uz pomoć djelovanja enzima lakaze i peroksidaze. Ovi enzimi katalitičkom reakcijom iniciraju proces kidanja kovalentne veze između fenolnog kisika i njegovog vodika, stvarajući slobodne radikale. Slobodni radikali teže ka stabilizaciji, te procesom, poznatim kao rezonantna stabilizacija, stvara se niz rezonantno-stabilnih slobodnih radikala koji su u konstantnoj ravnoteži jedan s drugim. Kada jedan slobodni radikal susretne drugoga, oni kombiniraju da bi dijelili svoje elektrone tvoreći novu kovalentnu vezu. Dva monomera mogu doći zajedno tvoreći dimer. Dimer i dalje ima slobodan fenol-hidroksil, te enzim može odstraniti vodik i elektron da tvori još jedan slobodan radikal. Dimer može kombinirati s monomerom ili drugim dimerom tvoreći još veću molekulu (trimer ili tetramer). Ovaj se proces nastavlja sve dok se kao krajnji rezultat ne dobije polimerna struktura. Kada sve ove činjenice vezano za stvaranje lignina zbrojimo, evidentno je da ove makromolekule nisu izgrađene nekakvom genetičkom prepiskom ili normalnim mehanizmom, već slučajnim sparivanjem. Krajnja konstitucija lignina je prema tome određena većinom po reaktivnosti i učestalosti građevnih jedinica uključenih u polimerizaciju (Antonović, 2008.).

Unatoč brojnim provedenim istraživanjima, struktura lignina i stupanj polimerizacije još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. To je uglavnom zbog nedostatka prikladnog analitičkog alata za pouzdano i opširno karakteriziranje tako kompleksnog sustava. Nekoliko je analitičkih tehnika koje su korištene u svrhu karakteriziranja ligninske molekulske mase od osmometrije, krioskopije, izopiestičke metode, ultrafiltracije do gel permeabilne kromatografije (GPC), MALDI-ToF MS i tehnike svjetlosnog raspršivanja; međutim različite analitičke tehnike pridonose neusklađenosti rezultata. Određivanje M_n , M_w i njihova distribucija daleko su od jednoglasnog prihvaćanja i još uvijek se vode rasprave (Crestini i sur., 2011.).

Polidisperznost je svojstvo svih lignina dobivenih bilo analitičkim ili tehnološkim postupcima. Najočitije objašnjenje ovog fenomena, koji nije nužno primjenjiv za sve prirodne polimere, je nasumična razgradnja prirodne stanične stijenke lignina kemijskim metodama tijekom procesa izolacije, gdje dobijemo topljive dijelove različitih veličina. S eksperimentalnog stajališta polidisperznost uzima u obzir i broj i srednju vrijednost težine molekularne težine

(M_n i M_w), koji se mogu odrediti različitim metodama, gdje se njihov omjer M_n/M_w izražava kao stupanj polidisperzije (Antolović, 2008.).

S obzirom da nije moguće izolirati ili odstraniti lignin iz lignoceluloznih sirovina bez njegove barem djelomične razgradnje, molekularna težina bilo kojeg istraživanog uzorka lignina ovisiti će o izvoru lignina, zbog svoje heterogenosti i strukturne raznolikosti.

Goriva proizvedena iz biomase već zamjenjuju fosilna goriva u svakodnevnom životu. Korištenje dijelova biomase i njihovih derivata, poput supstrata u kemijskoj industriji za dobivanje visokovrijednih tvari ili za farmaceutsku primjenu, još su u povojima. Lignin predstavlja jedini obnovljivi izvor čistih aromatskih kemikalija, a izvorna i učinkovita pretvorba lignina primjerice u aromatične monomere niže molekularne mase, kao građevne jedinice za proizvodnju polimera, predstavlja vrlo zanimljivu moguću buduću primjenu. Proces kidanja ugljik-ugljik i ugljik-kisik veza u ligninu predstavlja vrlo selektivnu depolimerizaciju kojom bi se moglo proizvesti čitav niz aromatskih monomera. Tehnologije koje se oslanjaju na selektivno kidanje veza u ligninu također imaju potencijal u proizvodnji novih vrsta građevnih jedinica za izgradnju polimera. U medicinskom i farmaceutskom području, lignin i njegovi derivat se mogu primjenjivati kao građevni dijelovi za izradu mikrokapsula ili kao antioksidanti s obzirom na antioksidativna svojstva polifenolnih strukturnih značajki lignina.

Postojeće i potencijalne primjene lignina kao obnovljive sirovine iz biomase su:

- **Primjena u proizvodnji čistih kemikalija** – (supstituirani) fenoli, fenolne kiseline, kateholi, vanilin, vanilinska kiselina, cinaminska i benzoeva kiselina, DMSO, DMS, ugljikov monoksid, metan, octena kiselina, etin, etilen, BTX, goriva;
- **Primjena u istraživanjima u području farmaceutike i primjena u farmaceutskoj industriji;**
- **Primjena u znanstvenim istraživanjima u području prehrambene tehnologije i primjena u prehrambenoj industriji**
- **Primjena u polimernom sektoru** – blokiranje kopolimera, proizvodnja termoplastike, poliuretana, makromolekula i jeftinih punila;
- **Proizvodnja aditiva za** – boje, premaze i surfaktante (Lange i sur., 2013.).

2.1.3.1. Metode izolacije lignina iz lignoceluloznih materijala

Lignin je drugi najzastupljeniji obnovljivi polimer, koji doprinosi s 30% ukupne težine i s čak 40% energije sadržane u lignoceluloznoj biomasi. Lignin se trenutno najčešće dobiva prilikom proizvodnje papira i biogoriva, gdje zapravo predstavlja otpad, ali moguće ga je i izolirati.

Zbog heterogene i amorfne strukture lignina i njegovog položaja unutar stanične stijenke, izolacija lignina u nepromijenjenom obliku i njegovom točnom određenju, na žalost još do danas nije moguća (Antolović, 2008.). Stoga ne postoji jedinstvena metoda izolacije lignina. Znanje o metodama izolacije, naročito znanje o utjecaju metode na strukturu lignina u sirovini je od presudne važnosti, jer predstavlja jedini izvor za dobivanje informacija o tome i služi za istraživanje osnovnog mehanizma mikrobiološke razgradnje (Lange i sur., 2013.).

Općenito metode izolacije lignina mogu se podijeliti u dvije grupe:

- metode u kojima lignin zaostaje kao talog,
- metode u kojima je lignin u otopini.

Vrste lignina koji se dobije ovisno o metodi izolacije:

- **Mljeveni drvni lignin (MWL - milled wood lignin)** – ovaj lignin se dobiva Björkmanovim postupkom. Fino mljeveno drvo ekstrahira se s neutralnim organskim otapalom (npr. 1,4-dioksan) radi uklanjanja stranih dijelova. Tijekom ovog procesa, samo male promjene se događaju u strukturi lignina, a dobiveni lignin se smatra najreprezentativnijim ligninom samljevenog uzorka. Međutim, MWL ne predstavlja onaj oblik lignina u drvetu koji postoji prije mljevenja uzorka.
- **Acidolizni lignin** – ovaj lignin se ekstrahira iz biljnog tkiva kiselinskom hidrolizom (0,2 M HCl u razrijeđenom 1,4-dioksanu, pri sobnoj temperaturi). Ovaj lignin ima niski udio ugljikohidratnih komponenti, a prikazuje raspodjelu veza za koje se pretpostavlja da su pod minimalnim djelovanjem izolacijskog postupka, te je vrlo blizak prirodnom ligninu. Postoje i modifikacija izvorne metoda upotrebom alkalnog tretmana prilikom izolacije ligninskog ekstrakta koja se zove **blaga acidoliza lignina**, te **tioacidoliza** gdje se koristi etanetiol umjesto vode. Ovim modificiranim metodama moguće je dobiti više prinose i jednostavnije smjese monomera.
- **Celulolitički enzimski lignin (CEL – Cellulolytic enzyme lignin)** – ovaj lignin je dobiven iz MWL nakon tretmana s komercijalno dostupnom celulazno-hemicelulaznom

smjesom radi uklanjanja ugljikohidratnih komponenti. Međutim, moguće je izdvojiti samo 85-88% polisaharida, ostatak ostaje vezan uz lignin. Strukturno, ovako dobiveni lignin je vrlo sličan onome iz originalnog uzorka.

- **Enzimski blago acidolizni lignin (EMAL - Enzymatic mild acidolysis lignin)** – EMAL lignin se dobiva zahvaljujući poboljšanju CEL načina dobivanja lignina. U ovom postupku dolazi do pucanja lignokarbohidratnih veza upotrebom blagih kiselina, ostavljajući eterske veze unutar ligninske strukture netaknutim. Nakon početne enzimске hidrolize, kruti otpad se ispire zakiseljenom vodom prije tretiranja sa dioksan/voda otopinom, koja sadrži 0,1 M klorovodične kiseline u inertoj atmosferi.
- **Kraftov lignin** – Kraftov lignin predstavlja ostatke nakon kemijskog procesa mljevenja prilikom proizvodnje papira. Lignin se taloži iz crnog luga. Kraftov lignin je strukturno visoko modificiran, budući da tijekom standardnog kraftovog procesa 70-75% hidroksilinih grupa postaje sulfonirano. Kraftov lignin je topiv u kiselim i lužnatim otopinama i u jako polarnim organskim otapalima.
- **Sulfonatni lignin (lignosulfonat)** - Lignosulfonat je sulfonirani lignin koji je uklonjen iz drveta postupkom sulfitnog pulpiranja. Lignosulfonati iz tvrdog i mekog drveta se dobivaju iz koncentrata otpadne pulpe pomoću Howardovog procesa nakon uklanjanja sumpora. Sulfonatni lignin je topiv u kiselim i lužnatim vodenim otopinama, te u visoko polarnim organskim otapalima, ali reakcije hidrolize na kraju mogu dovesti do prekomjernog sulfoniranja. Niti Kraftov lignin niti sulfonatni lignin nisu prikladni za proučavanje karakteristika prirodnog lignina. Međutim, oni su vrlo važni u industriji kao nusproizvod i njihova valorizacija je predmet brojnih istraživanja.
- **Organosolv lignin** – Organosolv lignin se dobiva u posebnom postupku nakon izdvajanja iz drvenih komponenti tretmanom s organskim otapalom tijekom organosolv procesa pulpiranja. Najpoznatija varijanta je Alicelov proces u kojem se koristi etanol ili smjesa etanola i vode, ali mogu se upotrebljavati i brojna druga otapala te kombinacije kiselih ili lužnatih vodenih otopina radi poboljšanja stupnja pulpinga. Organosolv lignin se može lako odvojiti od pulping otapala bilo da se uklanja i potom regenerira otapalo ili da se taloži s vodom popraćeno destilacijom radi oporavka otapala. Većina organosolv lignina je netopiva u kiselim vodenim

otopinama, ali je topiva u lužnatim otopinama i u mnogim polarnim organskim otapalima.

- **Pirolizni lignin** – Pirolitički procesi (termičko raspadanje u odsutnosti kisika) mogu se upotrebljavati za proizvodnju dijelova lignina koji se mogu upotrebljavati u biorafinerijskim procesima. Pirolitički procesi zahtijevaju relativno visoku temperaturu (450 °C) i karakterizira ih kratko vrijeme zadržavanja od samo 2 sekunde. Ugljen i plinovi su tipični nusproizvodi, a koriste se u procesu kako bi upotpunili zahtjeve za energijom u cjelokupnom procesu. Nema drugog otpada osim dimnih plinova i pepela. Glavni nedostatak leži u visokoj potrošnji ugljikohidrata kao goriva tijekom procesa. Pirolizni lignin nudi jedinstvenu priliku za proizvodnju specifičnih aromatskih ugljikovodika koje nije moguće proizvesti drugim postupcima.
- **Lignin parne eksplozije** – Parna eksplozija se sastoji od impregnacije biomase parom (180-230 °C) pod visokim tlakom (14-35 bara) tijekom kratkog vremena (1-20 min) nakon čega slijedi nagli pad tlaka. Proces parne eksplozije omogućuje otpuštanje pojedinih komponenti biomase, i ovaj proces se općenito koristi za proizvodnju celulozne pulpe. Kiselim ispiranjem ili ekstrakcijom s organskim otapalom moguće je obnoviti lignin iz tvrdog drveta čak do do 90% (Lange, 2013.).

Zbog strukturne raznolikosti koja je svojstvena za ligninsku biomasu i strukturnih promjena koje mogu uzrokovati razne metode koje se koriste za dobivanje ekstrakta lignina, razvijeno je nekoliko metoda za karakterizaciju lignina. Općenito, karakterizacija se može provesti izravno pomoću nemodificiranih ligninskih uzoraka ili ekstrakta lignina ili neizravnim putem, kemijskom modifikacijom uzoraka i ekstrakta. Prije određivanja lignina, uzorke je bolje obraditi instrumentalnim metodama nego kemijskim modifikacijama. Kvalitativna analiza koja za cilj ima isticanje prisutnosti karakterističnih funkcionalnih grupa u uzorku lignina, često je moguća na temelju kolorimetrijskih reakcija uzoraka lignina. Korištenjem prikladnih reagensa, dodatne ili prateće analize (npr. DPPH test) su moguće i kroz izravne i kroz neizravne metode (Lange i sur., 2013.).

Metode za određivanje sadržaja lignina u lignoceluloznim materijalima mogu se podijeliti na:

- **Izravne metode,**
- **Neizravne metode.**

U izravnim metodama, udio lignina se određuje iz taloga, dok se u neizravnim izračunava nakon određivanja polisaharida, određuje se spektrofotometrijskim metodama ili se dobiva iz reakcija lignina s oksidirajućim kemikalijama.

Jedna od najistaknutijih izravnih metoda za određivanje lignina je Klasonova metoda. Slijedeći originalni protokol, nakon tretiranja lignoceluloznog materijala s 72%-tnom sumpornom kiselinom, određuje se udio kiselinski netopivog dijela lignina u lignoceluloznom materijalu. Neizravna metoda je, na primjer određivanje utrošenog kisika (ovisno o utrošenom reagensu istovremeno se može dobiti kvalitativni rezultat), određivanje Kappa broja i postupak nitrozacije (Lange i sur., 2013.).

Zajedničko za sve metode određivanja lignina su problemi nastali iz tvari koje smetaju pri postupcima određivanja (ekstraktivni spojevi, produkti razgradnje polisaharida) i/ili nesigurnosti da li je sadržaj lignina u potpunosti snimljen (Antonović, 2008.).

Kvantifikacija specifičnih funkcionalnih grupa u ekstraktu lignina može se postići upotrebom instrumentalnih metoda, nakon tretiranja funkcionalnih grupa prikladnim reagensima. Plinska kromatografija, sama ili u kombinaciji s masenom spektrometrijom, kao i kromatografija isključenjem su drugi rutinski analitički alati za kvalitativnu i kvantitativnu analizu lignina, modificiranog lignina ili ligninskih razgradbenih produkata (Lange i sur., 2013.).

2.2. LIGNOCELULOZNI OTPAD

2.2.1. Drvo kao sirovina

Drvo je u svom izvornom obliku prirodan materijal, što znači da nakon što izvrši svoju dužnost, vraća se u prirodni ciklus, tako što se raspadne na svoje osnovne građevne elemente. Ono je vjerojatno najstarija sirovina koju je čovjek upotrebljavao za dobivanje energije. Tijekom povijesti čovjek je drvo koristio i za izradu oruđa, kao građevni materijal, te kao sirovinu za proizvodnju ugljena, katrana, smole i kalijevog karbonata. Početkom 19. stoljeća postupcima suhe destilacije, iz drveta su se proizvodili metanol i octena kiselina, tada vrlo cijenjene sirovine. Drvo je i danas izrazito cijenjena sirovina. Osim u izradi namještaja i kao građevni materijal, drvo je postalo i temeljna sirovina u proizvodnji papira, vlakna, vlakanca, celuloznih filmova, aditiva i mnogih drugih proizvoda.

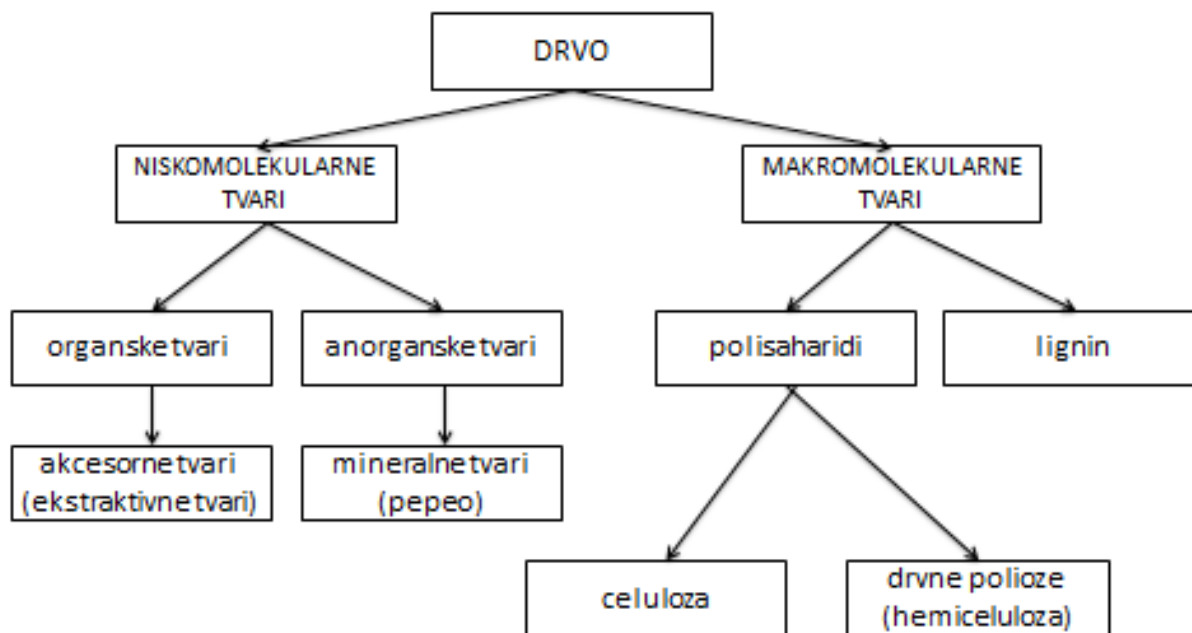
Drvo je multikomponentan, higroskopan, anizotropan, vlaknast, porozan, biorazgradiv materijal i obnovljiv izvor energije, a sva svojstva drva nalaze se u dobroj ravnoteži, što je jedan od razloga zašto je drvo tako blisko čovjeku (Antonović, 2010.).

Drvo je poput svakog biljnog materijala kompleks različitih kemijskih tvari. Pojam "kompleks" znači da nije poznato kako su pojedine tvari drva povezane međusobno u staničnim stijenkama te da li su te veze kemijskog (kovalentne veze) ili fizikalnog (molekularne veze) karaktera (Vidaković, 2012.). Elementarni sastav drveta prikazan je u **Tablici 1** i sastavljen je iz elemenata ugljika (C), vodika (H) i kisika (O), te relativno malog udjela dušika (N), zbog čega se on često zanemaruje (0,1-0,17%). Apsolutno suha tvar različitih vrsta drveta pokazuju male razlike u elementarnom sastavu.

Tablica 1: Prosječan elementarni sastav u apsolutno suhom drvetu (Vidaković, 2012.)

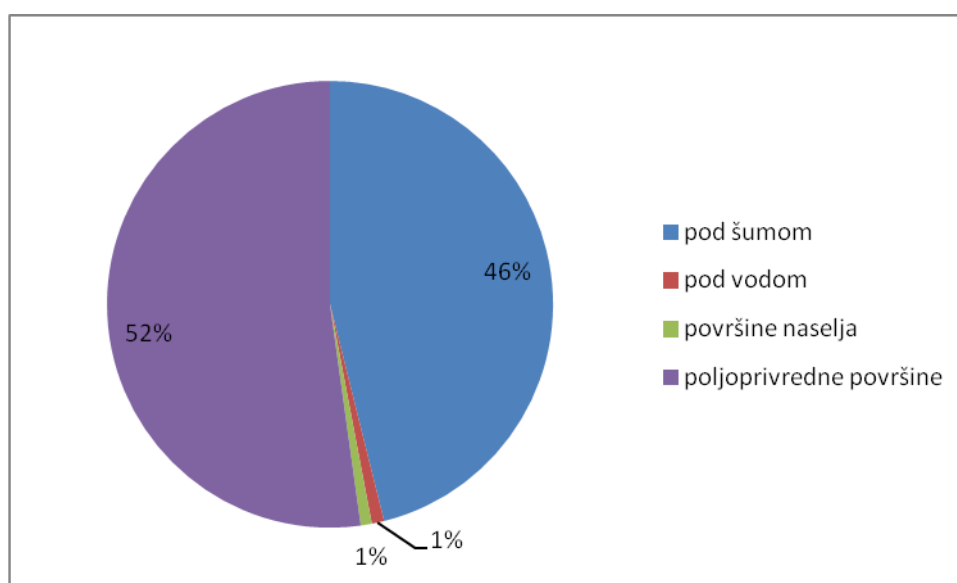
Element	%
C	49,5
H	6,3
O	44,2

Drvo se po kemijskoj sastavu (**Slika 2**) sastoji od makromolekularnih tvari, kao što su celuloza, drvene polioze (hemiceluloza) i lignina, koji su prisutni u svim vrstama drva i sporednih akcesornih tvari ili ekstraktivnog materijala drveta (tvari niske molekularne mase), kao što su ekstraktivne i mineralne tvari, neke organske tvari topive u vodi i anorganske tvari. Akcesorne sporedne tvari se razlikuju kod različitih vrsta drveća. Sadržaj celuloze kod svih vrsta drveta je više ili manje isti (40-45% na apsolutno suhu tvar), dok udio hemiceluloze može varirati od 25-35%, a lignina 20-30% izraženo na apsolutno suhi uzorak. Udio akcesornih tvari se najčešće kreće oko 5%.



Slika 2: Shema kemijskog sastava drveta (Vidaković, 2012.)

Drvo je vrlo dobra lignocelulozna sirovina zbog visokog udjela celuloze i hemiceluloze, koje je moguće razgraditi do jednostavnih šećera i fermentacijom pretvoriti u etanol. Međutim, drvo sadrži i relativno puno lignina, kojeg je potrebno najprije ukloniti.



Slika 3: Pedološka podjela tla Republike Hrvatske (prema Tomić, 2008.)

Šume u Republici Hrvatskoj zauzimaju gotovo 50% površine (**Slika 3**). Od ukupnog godišnjeg etata, oko 30% se iskoristi za trupce, 10% kao celulozno drvo, 20% kao ogrjevno drvo, a ostatak od 40% ostaje u šumi kao otpad. Istraživanjem se utvrdilo da od ukupne količine otpada koja ostaje u šumi oko 62,5% bi se moglo iskoristiti za proizvodnju bioenergije, a 37,5% bi ostalo u šumi kao otpad (Tomić i sur., 2008.). Za proizvodnju bioenergije, također bi se mogao iskoristiti i razni drveni otpad, poput piljevine, strugotina, kore i sl. koji zaostaju kao otpad u raznim industrijskim i obrtničkim postrojenjima.

2.2.2. Repini rezanci kao sirovina

Rezanci šećerne repe, nusprodukt iz šećerne industrije, se svake godine proizvode u velikim količinama (Hutnan i sur., 2000.). U nekim zemljama, kao što je Hrvatska, rezanci šećerne repe se koriste kao stočna hrana, dok se u drugim zemljama odlažu na deponije.

Preradom 1 tone šećerne repe, proizvede se oko 250 kg iscijeđenih prešanih rezanaca šećerne repe sa udjelom vode od 75-80%. To se može još preraditi u 70 kg suhih rezanaca šećerne repe sa udjelom vode od oko 10% (Spagnuolo i sur., 1997.).

U Hrvatskoj je u 2013. godini pod šećernom repom bilo 20 000 hektara, sa rekordnim prinosom koji je iznosio 51,8 tona po hektaru. Tijekom proizvodnje konzumnog šećera prošle godine je kao nusproizvod dobiveno oko 72 660 tona suhih rezanaca šećerne repe.

Sušeni repini rezanci se sastoje od 75-80% polisaharida, 1-2% masti, 10-15% proteina, 3-12% pepela i 1-6% lignina. Prisutne polisaharide čine 22-30% celuloza, 25-30% hemiceluloza i 25% pektina (Benes i sur., 2013.).

2.3. GLJIVE

2.3.1. Općenito o gljivama

Gljive ili fungi su eukarioti, nefotosintetski organizmi, čije su stanice obavijene staničnom stijenkom koja je najčešće sastavljena od polisaharida-hitina. Mogu biti jednostanični i češće su višestanični organizmi. Obuhvaćaju kvasce, plijesni i makroskopske organizme često nazivane mesnatim gljivama. Budući da imaju izrazitu biokemijsku aktivnost, mnoge gljive imaju i veliku komercijalnu ulogu u proizvodnji piva, vina, fermentiranih mliječnih proizvoda

te antibiotika (Duraković, 1996.). Također mnoge gljive mogu i uzrokovati bolesti kod ljudi i životinja, te uzrokovati kvarenje namirnica ili čak i sintetizirati jake toksine.

Najveći broj gljiva jesu saprofiti, odnosno organizmi koji potrebne hranjive tvari dobivaju iz mrtve organske tvari (Duraković i Duraković, 2003.). Upravo zbog toga najčešće rastu na mjestima gdje postoji iskoristivi organski materijal, te u tamnom i vlažnom okolišu. Gljive mogu izlučivati hidrolitičke enzime koji razgrađuju okolišne supstrate, te potom apsorbirati otopljene hranjive tvari. One organski materijal upotrebljavaju i kao izvor ugljika, elektrona i energije, te se nazivaju i kemoorganoheterotrofima. Primarni polisaharid koji gljive pohranjuju jest glikogen. Većina gljiva iskorištava ugljikohidrate (prvenstveno glukozu ili maltozu) i dušične spojeve za sintezu njihovih vlastitih aminokiselina i proteina (Duraković i Duraković, 2003.).

Gljive su prilagođene rastu u okolišu koji je nepovoljan za rast bakterija, te se mogu očekivati i na mjestima gdje se ne očekuje mikrobni rast. Stoga se gljive mogu naći i u kiselim pH-područjima ($\text{pH} = 5,0$), u okolišu s većom koncentracijom soli i šećera (otpornije su na osmotski tlak), te na mjestima s manjim udjelom vode. One su uglavnom aerobni organizmi i za rast im je potrebno manje dušika nego bakterijama. Gljive mogu iskorištavati složene ugljikohidrate, primjerice lignin (drvo), koje najveći broj bakterija ne može metabolizirati. Te osobine omogućuju gljivama rast u tako nevjerojatnim uvjetima i na supstratima kao što su obojeni zidovi ili kožnata obuća (Duraković, 1996.).

2.3.2. Klasifikacija

Svaka medicinski važna gljiva pripada jednoj od pet taksonomskih skupina (razreda) koje se razlikuju na osnovi tipa spora te po morfologiji hifa i spolnom ciklusu. Te su skupine *Deuteromycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* i *Oomycetes* (Duraković i Redžepović, 2002.).

Podrazred *Basidiomycetes* uključuje gljive koje rastu na drveću, jestive gljive, gljive puhare, hrđe, snijeti i otrovne gljive. Najveći ih broj žive kao saprofiti i razgrađuju biljni materijal napose celulozu i lignin (Duraković i Duraković, 2003.).

2.3.3. Gljive bijelog truljenja

Gljive truležnice su gljive koje imaju sposobnost razgradnje celuloze, hemiceluloze, lignina i pektina do CO_2 , H_2O i pepela. Najčešće dolaze iz podrazreda *Ascomycetes* i *Basidiomycetes*, te se dijele na gljive smeđe truleži, gljive mokre truleži i gljive bijele truleži. Gljive smeđeg truljenja razgrađuju celulozu i hemicelulozu, dok lignin ne. Gljive mokrog truljenja su anaerobne gljive, te najčešće uzrokuju trulež drveta pod vodom.

Gljive bijelog truljenja su najzastupljeniji razgrađivači drveta u prirodi. Posjeduju različite enzime, poput hidrolitičkih (celulaze, pektinaze, ksilaze) i izvanstaničnih lignolitičkih enzima (lignin peroksidaze, mangan peroksidaze i lakaze). Njihova strategija je da razgrađuju lignin u drvu i oslobađaju pristup celulozi i hemicelulozi koji su ugrađeni u matrice lignina (Hammel, 1997). Razlikuju se dva tipa bijelog truljenja: simultana (istovremena) razgradnja svih polimera u drvetu i selektivna razgradnja lignina u drvetu (Sigoillot i sur., 2012.). Tijekom simultane razgradnje koju provode primjerice *T. versicolor* i *P. chrysosporium*, više različitih fungalnih enzima djeluje istovremeno razgrađujući celulozu, hemicelulozu i lignin (Sigoillot i sur., 2012.). Selektivni razgrađivači lignina su posebno zanimljivi sa stajališta primjene u biotehnologiji, obzirom da uklanjaju lignin, a celulozu ostavljaju neoštećenom. Razgradnja lignina pomoću ovih gljiva odvija se tijekom njihovog sekundarnog metabolizma i obično u uvjetima u kojima ima malo dušika (Lankinen, 2004.).

2.3.4.1. *Phanerochaete chrysosporium*

Phanerochaete chrysosporium je gljiva bijelog truljenja iz podrazreda *Basidiomycetes* koja raste pri temperaturi od oko 40°C, stoga se može naći u šumama Sjeverne Amerike, na području Europe i sve do Irana. Ova visoka temperatura omogućuje joj rast na kompostnim hrpama drveća što pruža neke nove mogućnosti u biotehnologiji. Osnovna uloga *P. chrysosporium* je razgradnja lignina u različitim vrstama biljaka i drveća, čime pomaže u prirodnom kruženju tvari kao razgrađivač. (<http://genome.jgi-psf.org/whiterot1/whiterot1.home.html>)

P. chrysosporium je jedna od prvih plijesni za koju je ustanovljeno da može razgraditi lignin i najčešće je proučavana. Ona izlučuje enzime lignin peroksidazu i mangan peroksidazu, koji djeluju na nespecifičan način, stvarajući slobodne radikale lignina koji se potom spontano

raspadaju. Ovaj nespecifičan način razgradnje i oksidativan potencijal enzima koje izlučuje *P. chrysosporium* otvaraju nove mogućnosti za upotrebu u bioprocima poput procesa izbjeljivanja u industriji papira i tkanine, detoksikacije i dekolorizacije industrijskih otpadnih voda, bioremedijacija odlagališta opasnog otpada ili biorazgradnja teško razgradivog lignina u poljoprivrednom otpadu s ciljem njegove daljnje upotrebe za ishranu stoke ili za proizvodnju bioetanola (nastaje sirovina s visokim udjelom fermentabilnih šećera) (Fraser, 2005.).

2.3.4.2. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor je gljiva bijelog truljenja iz podrazreda *Basidiomycetes*, koja proizvodi tri lignolitička enzima, lignin peroksidazu, mangan peroksidazu i lakazu. Vrlo učinkovito razgrađuje lignin iz lignoceluloznih materijala, policikličke aromatske ugljikovodike, polikolorirane bifenilne smjese i brojna sintetska bojila.

Postoji nekoliko objavljenih radova u kojima je proučavan mehanizam enzimске oksidacije lignina za svaki lignolitički enzim, a najčešće proučavan je bio lakaza. Nakon utvrđenog mehanizma enzimске oksidacije, zaključilo se da je *T. versicolor* gljiva koja može imati vrlo široku primjenu. Kultura *T. versicolor* ili njezini lignolitički enzimi mogu se koristiti kao biokatalizatori u različitim industrijskim procesima, poput obezbojenja industrijskih boja i pročišćavanja otpadnih voda (Xavier i sur., 2007.).

Selektivni eksperimentalni uvjeti pružaju veću proizvodnju lignolitičkih enzima, ali više od samog rasta gljive važnija je industrijska primjena, stoga je urađeno nekoliko studija kako bi se pronašla što bolja eksperimentalna strategija (Nowak i sur., 1998.). S praktičnog stajališta, predložene biotehnološke primjene za *T. versicolor* ovisit će o boljem razumijevanju lignolitičkog sustava.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada je bio **a)** odrediti udio lignina i celuloze u lignoceluloznim materijalima (piljevina hrasta cera, bukve i hrasta kitnjaka zaostalih u pilanama nakon obrade drveta te repinim rezancima) prije i nakon njihove obrade s različitim mikroorganizmima, te **b)** istražiti utjecaj veličine pora sinter lončića na udio lignina u uzorcima repinih rezanaca prije, tijekom i nakon biološke obrade repinih rezanaca u laboratorijskim staklenkama i bioreктору.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Lignocelulozni materijali

- Piljevina cera biološki obrađena s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium*. Procesi biološke obrade su provedeni u laboratorijskim staklenkama. Za analizu su korišteni uzorci prije fermentacije, te nakon 45. dana fermentacije.
- Piljevina bukve biološki obrađena s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium*. Procesi biološke obrade su provedeni u laboratorijskim staklenkama. Za analizu su korišteni uzorci prije fermentacije, te nakon 45. dana fermentacije.
- Piljevina hrasta kitnjaka biološki obrađena s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium*. Procesi biološke obrade su provedeni u laboratorijskim staklenkama. Za analizu su korišteni uzorci prije fermentacije, te nakon 45. dana fermentacije.
- Repini rezanaci biološki obrađeni s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium*. Procesi biološke obrade su provedeni u laboratorijskim staklenkama. Za analizu su korišteni uzorci prije fermentacije, te nakon 10., 20. i 30. dana fermentacije.
- Repini rezanci biološki obrađeni s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium* u aeriranom bioreктору. Fermentacija je provođena pri 27 °C. Zrak je uvođen u bioreaktor s protokom od 3 dm³/min/kg_{suhog uzorka}. Supstrat je mehanički miješan 5 minuta svaka 24 sata. Uzorci su uzimani svaki dan radi utvrđivanja sadržaja suhe tvari i svakih 10 dana za mjerenje kemijskog sastava (Tišma i sur., 2013.). Za analizu su korišteni uzorci prije početka fermentacije, te nakon 1., 10., 15., 20., 25., i 30. dana fermentacije.

3.2.2 Kemikalije

Tijekom rada korištene su sljedeće kemikalije:

- 80 % CH_3COOH (Carlo Erba Reagens Chaussee du Vexion VAL DE REUIL (Francuska));
- 72 % H_2SO_4 (Kemika d.d., Heinzelova 53 Zagreb, Hrvatska);
- Konc. HNO_3 (Carlo Erba Reagens Chaussee du Vexion VAL DE REUIL (Francuska));
- 95 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Carlo Erba Reagens Chaussee du Vexion VAL DE REUIL (Francuska));
- 80 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Carlo Erba Reagens Chaussee du Vexion VAL DE REUIL (Francuska));
- Aceton

3.3. APARATURA

3.3.1. Vodena kupelj

Termostatiranje uzoraka tijekom ekstrakcije i hidrolize kod određivanja lignina je provedeno u vodenoj kupelji (Julabo, tip SW 23, Labortechnik GmbH, Seelbach, Njemačka).

3.3.2. Centrifuga

Uzorci su centrifugirani na centrifugi (Sigma, tip 2-16 PK, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka)

3.3.3. Vakuum sušionik

Iz uzoraka je, tijekom određivanja udjela lignina, uklanjan aceton sušenjem preko noći pri 40 °C u vakuum sušioniku (Kambič, Slovenija, VS-50 SC).

3.3.4. Autoklav

Uzorci su sterilizirani pri 121 °C tijekom 1 h u autoklavu (TIP 7518945, Beograd).

3.3.5. Sušionik

Uzorci su sušeni do konstantne mase u sušioniku (ST-01/02 Instrumentaria, tvornica medicinskih instrumenata, Zagreb), tijekom određivanja udjela lignina, celuloze i suhe tvari.

3.4. METODE

3.4.1. Određivanje suhe tvari termogravimetrijskom metodom

Suha tvar je određena sušenjem $2,0 \pm 0,5$ g uzorka u sušioniku (ST-01/02, Instrumentaria, tvornica medicinskih instrumenata, Zagreb) pri temperaturi od 105°C . Proces sušenja je provođen kontinuirano 4 h, s dosušivanjem od po 1 h do postizanja konstantne mase. Sušenje je provođeno u prethodno pripremljenim i izvaganim aluminijskim posudicama za sušenje.

Udio suhe tvari u uzorcima je izračunavan prema formuli (1):

$$W_{s.tvari} = \left[1 - \frac{m_1 - m_2}{m_1} \right] \cdot 100 \quad (1)$$

gdje je:

$W_{s.tvari}$ – udio suhe tvari (%),

m_1 – masa uzorka prije sušenja (g),

m_2 – masa uzorka nakon sušenja (g).

3.4.2. Određivanje kiselinski netopivog Klason-ovog lignina

Ova metoda se sastoji od dva dijela. U prvom dijelu je provedena ekstrakcija pomoću 80 %-tnog etanola, a u drugom dijelu hidroliza s 72 %-tnom sumpornom kiselinom.

U kivete je odvagano oko 2,5 g uzorka (2 g za određivanje suhe tvari i ostalo za lignin). U kivete je zatim dodano 40 mL 80 %-tnog etanola. Uzorak u kiveti s etanolom je dobro promiješan na vrtložnoj miješalici (Vortex), do otapanja uzorka. Zatim je uzorak stavljen u vodenu kupelj na 80°C / 30 min.

Nakon termostatisiranja, kivete su centrifugirane pri 6000 okr/min tijekom 10 minuta. Nakon centrifugiranja etanol je odekantiran, te je ponavljen je cijeli postupak. Postupak s etanolom, termostatisiranjem, centrifugiranjem i odekantiranjem je ponavljan tri puta. Nakon

posljednjeg, trećeg postupka odekantiranja etanola, dodana je ista količina acetona te je centrifugirano na 6000 okretaja/min kroz 10 minuta.

Nakon centrifugiranja, višak acetona je odekantiran, a ostatak je profiltriran preko Bücherova lijevka. Kruti ostatak je prenesen na stakleni tanjurić i ostavljen preko noći u sušioniku (KAMBIČ, TIP VS-50 SC, Laboratorijska oprema, Slovenija) na 40 °C.

Postupak hidrolize proveden je na dva načina, vaganjem ekstrahiranog i osušenog uzorka (100 ± 1 mg) u Eppendorf tubice ili vaganjem uzorka direktno u staklenu čašu. U prvom slučaju, uzorcima u Eppendorfici je dodan 1 mL 72 %-tne sumporne kiseline, te je obavljeno miješanje na vrtložnoj miješalici, Vortexu, dok se sav suhi materijal nije otopio u kiselini.

Nakon toga tubice s uzorcima su termostatirane jedan sat na 30 °C. Uzorci su povremeno miješani na Vortexu. Nakon jednog sata, uzorci su prebačeni u čaše od 150 mL, te je dodano 28 mL destilirane vode i čaše su prekrivene aluminijskom folijom. U drugom slučaju, uzorcima u čaši, dodan je 1 mL 72 %-tne sumporne kiseline, te je obavljeno ručno miješanje pomoću staklenog štapića. Čaše s uzorcima su termostatirane na 30 °C tijekom jednog sata, s povremenim miješanjem sa staklenim štapićem. Nakon termostatiranja, čašama s uzorcima je dodano 28 mL destilirane vode i prekrivene su s aluminijskom folijom.

Tako pripremljene čaše s uzorcima su sterilizirane u autoklavu pri 121 °C tijekom jednog sata. Nakon autoklaviranja, uzorci su filtrirani još vrući i ispirani s destiliranom vodom (oko 250 mL). Filtracija i ispiranje je provedeno u staklenim sinter lončićima različitog poroziteta, koji su prethodno osušeni i izvagani. Uzorci su ispirani do neutralne reakcije. Nakon dovršenog ispiranja, sinter lončići s uzorcima su sušeni četiri sata pri 105 °C u sušioniku (ST-01/02, Instrumentaria, tvornica medicinskih instrumenata, Zagreb), nakon čega su hladjeni jedan sat u eksikatoru i vagani na analitičkoj vagi. Sinter lončići s uzorcima su dosušivani, do konstantne mase.

Udio lignina u uzorcima je izračunat prema formuli (2):

$$LN = \frac{m_{\text{ostatka}}}{m_{\text{s.tvari}}} \cdot 100 \quad (2)$$

gdje je,

LN – udio lignina u uzorcima (%),

m_{ostatka} – masa krutog ostatka na sinter lončiću nakon sušenja do konstantne mase (g)

m_{stvari} – masa apsolutno suhog uzorka prije kiselinske hidrolize (g).

3.4.3. Određivanje udjela celuloze u lignoceluloznim materijalima

Prije određivanja udjela celuloze, sa ciljem uklanjanja ekstraktivnih tvari, provedena je ekstrakcija smjesom etanola i benzena. Odvagano je 3,0 g prethodno usitnjenog i homogeniziranog uzorka u ekstrakcijske tuljke. Dodano je 50 mL ekstrakcijskog otapala u prethodno osušene i izvagane eksikatorske posude, koje su zatim stavljene u ekstrakcijsku jedinicu SOXTEC SYSTEM 1040 Extraction Unit (Foss Tecator) na ploču za zagrijavanje. Kao ekstrakcijsko otapalo korištena je smjesa otapala etanol : benzen = 50 : 50. Ekstrakcija je provedena u dvije faze u ukupnom trajanju od 45 min Faza 1 – „boiling“ u trajanju od 15 min i faza 2 – „rinsing“ u trajanju od 30 min. Nakon završetka ekstrakcije, ekstrakcijske posude s uzorcima su sušeni do konstantne mase pri 80 °C u sušioniku.

Za daljnji postupak određivanja udjela celuloze, izvagano je 0,8 g ekstrahiranog uzorka i stavljeno u staklene epruvete. Uzorcima je zatim dodano 30 mL smjese otapala koja se sastoji od 80%-tne octene kiseline i koncentrirane dušične kiseline u omjeru 10 : 1. Epruvete s uzorcima i kiselinama su stavljene u vodenu kupelj pri 100 °C tijekom jednog sata. Epruvete su uronjene u vodenu kupelj tako da je razina vode vodene kupelji iznad razine uzoraka u epruveti. Na epruvete su stavljene staklene lijevci kako bi se tijekom termostatisiranja postizao refleks.

Nakon jednosatnog termostatisiranja, uzorci su filtrirani preko filter papira na Bücherovom lijevku i isprani dva puta sa 95%-tnim etanolom. Uzorci su preneseni s filter papira u prethodno pripremljene i izvagane aluminijske posudice i sušeni do konstantne mase pri 105 °C (m_1) u sušioniku (ST-01/02, Instrumentaria, tvornica medicinskih instrumenata, Zagreb).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Uzorci su premješteni iz aluminijskih posudica u porculanske lončiće pomoću 95%-tnog etanola i zatim stavljeni u vodenu kupelj, dok nije ispario sav etanol. Uz pomoć 72%-tne sumporne kiseline, uzorci su kvantitativno premješteni iz porculanskih lončića u staklene epruvete i stavljeni u vodenu kupelj na 30 °C. Uzorci su termostatirani 1 h, a po potrebi i dulje, do potpunog otapanja uzorka u kiselini. Tijekom termostatiranja, povremeno se uzorak ručno miješao staklenim štapićem. Zatim su uzorci filtrirani preko prethodno pripremljenih i izvaganih sinter lončića. Tijekom filtriranja uzorci su ispirani 80%-tnim etanolom. Sinter lončići s uzorcima su stavljeni u sušionik (ST-01/02, Instrumentaria, tvornica medicinskih instrumenata, Zagreb) na 105 °C i sušeni do konstantne mase (m_2).

Udio celuloze u uzorcima je računato prema formuli (3):

$$m_{celuloze} = m_1 - m_2 \quad (3)$$

$$C = \frac{m_{celuloze}}{m_{aps.}} \cdot 100 \quad (4)$$

Gdje je:

C – udio celuloze u uzorcima (%),

m_1 – masa uzorka nakon sušenja do konstantne mase u aluminijskim posudicama (g),

m_2 – masa uzorka nakon sušenja do konstantne mase u sinter lončićima (g),

$m_{aps.}$ – masa apsolutno suhog uzorka (g).

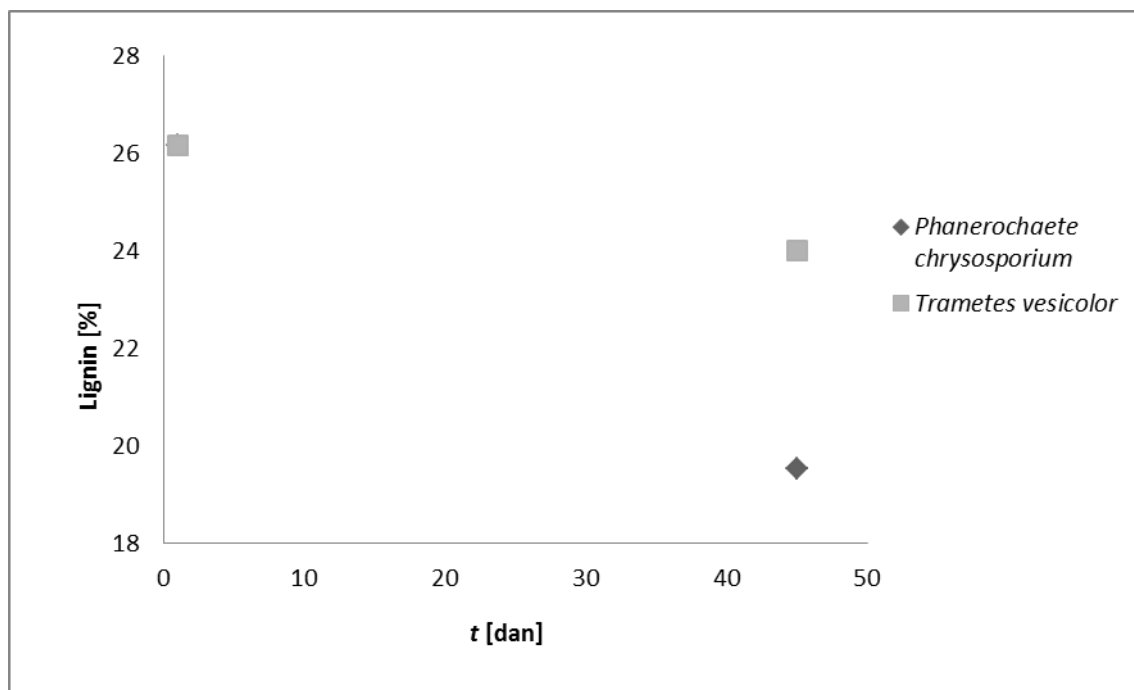
4.REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UDIO LIGNINA U LIGNOCELULOZNIM SIROVINAMA

Udio lignina u lignoceluloznim sirovinama prije i nakon biološke obrade s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium* određen je prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.4.2.** Uzgoj mikroorganizama na lignoceluloznim sirovinama proveden je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Fermentacija na čvrstim nosačima (SSF) definirana je kao fermentativni proces koji se izvodi u odsutnosti slobodne vode na materijalima koji nisu topljivi i koji djeluju kao fizički nosač ili kao izvor hranjivih tvari za mikroorganizme (Tišma i sur., 2013.).

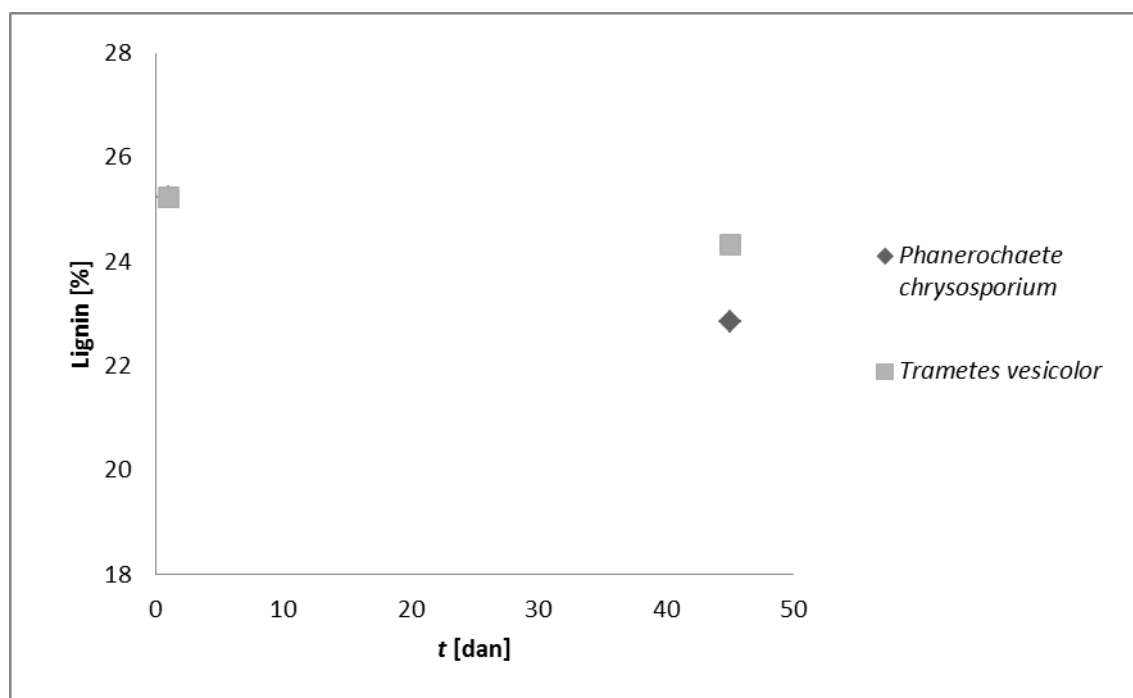
Udio lignina u uzorcima piljevina drveta bukve (*Fagus sylvatica*), hrasta kitnjaka (*Quercus petraea*) i cera (*Quercus cerris*) određivan je prije i 45 dana nakon fermentacije.

Slika 4 prikazuje rezultate udjela lignina u uzorcima piljevine bukve prije i nakon fermentacije u trajanju 45 dana s *T. versicolor* i *P. chrysosporium*. Napravljene su 2 paralele. Standardna devijacija je bila ispod 0,75. Na osnovu rezultata konverzije lignina koja je nakon 45 dana iznosila 8,23% za uzorke piljevine bukve obrađene s *T. vesicolor* i 25,42% za uzorke piljevine bukve obrađene s *P. chrysosporium* može se zaključiti da je *P. chrysosporium* pogodniji mikroorganizam za razgradnju lignina iz piljevine bukve.



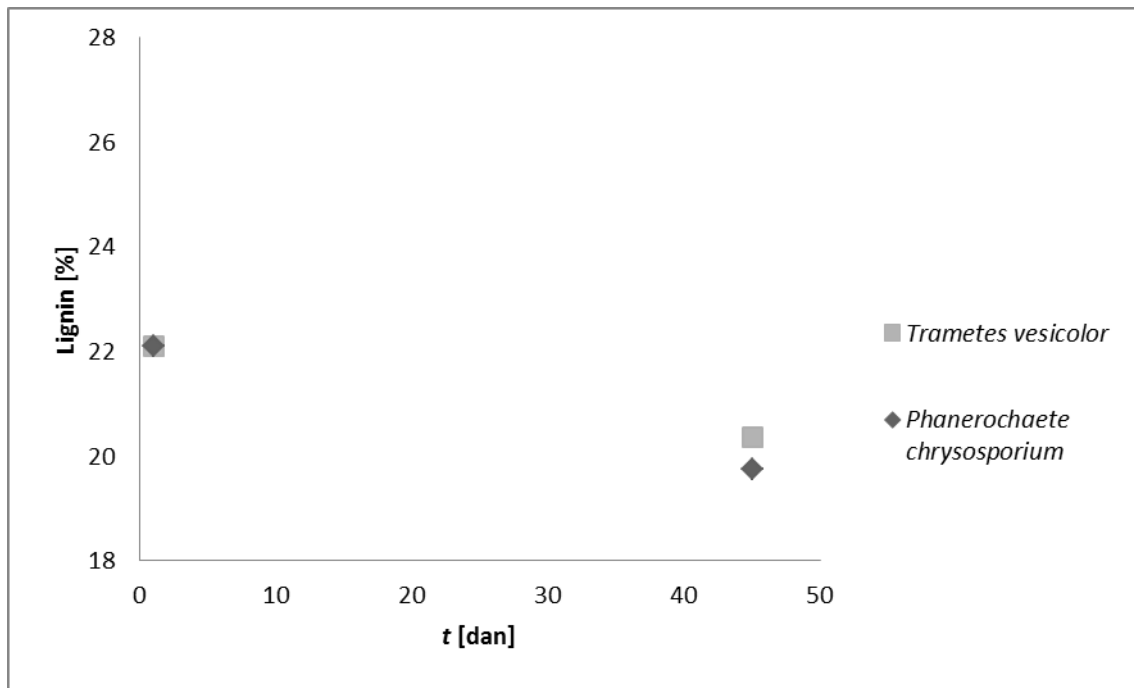
Slika 4: Promjena udjela lignina u uzorcima piljevini bukve prije i nakon fermentacije s *T. versicolor* i *P. chrysosporium*

Rezultati promjene udjela lignina u piljevini cera prije i nakon fermentacije s *T. versicolor* i *P. chrysosporium* prikazani su na **Slici 5**. Za napravljene 2 paralele, standardna devijacija je bila do 2,70. Upotrebom *P. chrysosporium* postignuta je viša konverzija ($X = 9,47\%$) u odnosu na pokus proveden s *T. versicolor* gdje je postignuta niska konverzija od samo 4,00%.



Slika 5: Promjena udjela lignina u uzorcima piljevine cera prije i nakon fermentacije s *T. versicolor* i *P. chrysosporium*

Slika 6 prikazuje rezultate o promjeni udijelu lignina u uzorcima piljevine hrasta kitnjaka prije i nakon fermentacije u trajanju 45 dana s *T. versicolor* i *P. chrysosporium*. Standardna devijacija u ovom slučaju, za napravljene 2 paralele, bila je do 2,54. Konverzija lignina u piljevini hrasta kitanjaka tretiranog s *P. chrysosporium* bila je 10,58%, a u pokusu s *T. versicolor* iznosila je 7,89%. I u ovom primjeru može se zaključiti da je ovaj soj *P. chrysosporium* proizvodio više ekstracelularnih enzima za razgradnju lignina u odnosu na *T. versicolor*.



Slika 6: Promjena udjela lignina u piljevini hrasta kitnjaka prije i nakon fermentacije s *T. versicolor* i *P. chrysosporium*

Na osnovu dobivenih rezultata određivanja udjela lignina kod piljevina bukve, cera i hrasta kitnjaka iz kojih se vidi da je došlo do konverzije od 4,00% do 8,23% za *T. versicolor* i od 9,47% do 25,42% za *P. chrysosporium*, može se zaključiti da obje plijesni proizvode lignolitičke enzime i razgrađuju lignin. Tijekom provedbe filtracije uzoraka, dolazilo je do začepjenja pora sinter lončića, što je vidljivo i iz dobivenih visokih vrijednosti standardne devijacije (do 2,70), što je najvjerojatnije uzrokovano adsorpcijom spora plijesni na supstrat. Zbog nemogućnosti odvajanja spora plijesni od supstrata, smatra se da je konverzija lignina u ovim slučajevima bila i viša od navedene. Na osnovi toga može se zaključiti da ova metoda nije prikladna za određivanje lignina za ovaj tip supstrata.

Repini rezanci predstavljaju nusproizvod u proizvodnji šećera, te se najčešće koriste kao stočna hrana, jer imaju puno hranjivih sastojaka. Vrlo su zanimljiva sirovina za proizvodnju bioplina, te zbog lignoceluloznih polimernih sastavnica, repini rezanci predstavljaju i potencijalnu sirovinu za biotehnološku proizvodnju.

Fermentacija repinih rezanaca provedena je 30 dana s *T. versicolor* i *P. chrysosporium* u staklenkama gdje nije bila osigurana dodatna aeracija, odnosno kisik iz zraka je difundirao

kroz papirni ubrus do supstrata, i u aerobnom bioreaktoru u kojem je kontinuirano provođena aeracija sa zrakom koji je dopreman pomoću kompresora. Tijekom fermentacije uzimani su uzorci, te je u njima određen udio lignina prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.4.2.**

Tablica 2: Udio lignina u uzorcima repinih rezanaca fermentiranih s *T. vesicolor* u aerobnom bioreaktoru

UZORCI	LIGNIN [%]	STANDARDNA DEVIJACIJA	BROJ UZORAKA [n]
početni uzorak	6,93	1,04	2
1. dan	3,65	3,30	2
15. dan	10,72	8,44	2
20. dan	6,32	4,38	2
25. dan	9,27	5,71	2
30. dan	3,91	0,00	1

Tablica 3: Udio lignina u uzorcima repinih rezanaca fermentiranih s *P. chrysosporium* u aerobnom bioreaktoru

UZORCI	LIGNIN [%]	STANDARDNA DEVIJACIJA	BROJ UZORAKA [n]
početni uzorak	6,93	1,04	2
1. dan	4,68	0,64	2
10. dan	3,93	1,06	4
20. dan	7,58	1,35	2
30. dan	8,48	1,19	3

Tablica 4: Udio lignina u uzorcima repinih rezanaca fermentiranih s *T. vesicolor* u tikvici

UZORCI	LIGNIN [%]	STANDARDNA DEVIJACIJA	BROJ UZORAKA [n]
početni uzorak	6,93	1,04	2
10. dan	5,55	2,69	2
20. dan	3,06	1,46	2
30. dan	5,01	2,10	2

Tablica 5: Udio lignina u uzorcima repinih rezanaca fermentiranih s *P. chrysosporium* u tikvici

UZORCI	LIGNIN [%]	STANDARDNA DEVIJACIJA	BROJ UZORAKA [n]
početni uzorak	6,93	1,04	2
10. dan	3,93	0,65	2
20. dan	4,49	1,28	2

Tijekom provedbe ovim mjerenja došlo je do velikih odstupanja u analizama lignina u uzorcima repinih rezanaca, u oba slučaja, kad su fermentacije provedene u staklenkama i u bioreaktoru. Pretpostavka je bila da će dodatna aeracija pospješiti proces razgradnje lignina, no analizom to nije pokazano zbog nemogućnosti kvantificiranja „stvarne“ mase zaostalog lignina od „prividne“ mase uzrokovane zbog zaostatka spora mikroorganizma na sinter lončićima.

U prethodnim diplomskim radovima istraživao je proces razgradnje lignina i celuloze u repinim rezancima pomoću *Aspergillus niger* (Jozić, 2013.) i *P. chrysosporium* (Grgić, 2014.), te proces razgradnje ukupnog organskog ugljika (TOC) u piljevinama i repinim rezancima pomoću različitih mikroorganizama. Pri razgradnji repinih rezanaca, korišteno je pet vrsta mikroorganizama (*Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *P. chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispota* i *Dichomitus squalens*), dok su u svrhu istraživanja razgradnje različitih piljevina drveta (piljevina bukve, hrasta i cera) korištene *Aspergillus niger*, *Aspergillus*

ochraceus i *Phanerochaete chrysosporium* (Čubel, 2014.). Svi autori su naveli poteškoće tijekom procesa određivanja lignina u uzorcima repinih rezanaca obrađenih s različitim filamentoznim mikroorganizmima. U ovom radu je istraživana sama metoda određivanja lignina u uzorcima repinih rezanaca koji su obrađeni s dvije različite gljive bijelog truljenja *T. vesicolor* i *P. chrysosporium*.

4.2. USPOREDBA SINTER LONČIĆA RAZLIČITOG POROZITETA

Usporedba sinter lončića napravljena je zbog velikog odstupanja u rezultatima za paralele istog uzorka. Usporedba je provedena za sinter lončiće označene brojevima 1, 2 i 3. Pri usporedbi sinter lončića korišteni su uzorci repinih rezanaca fermentirani s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium* u aerobnom bioreaktoru.

Tablica 6 prikazuje rezultate usporedbe sinter lončića označenih brojevima 1 i 2 za uzorak repinih rezanaca fermentiranih s *P. chrysosporium* u aerobnom bioreaktoru. Rezultati su prikazani kao udio lignina izraženog u postocima filtriranih preko sinter lončića 1 i 2, te kao srednja vrijednost oba rezultata sa izračunatim odstupanjem izraženim preko standardne devijacije.

Tablica 6: Udio lignina u uzorcima repinih rezanaca tijekom fermentacije s *P. chrysosporium* u aerobnom bioreaktoru i filtriranih preko sinter lončića 1 i 2, prema broju uzoraka n = 1

UZORCI	LIGNIN [%] - SINTER LONČIĆ 1	LIGNIN [%] - SINTER LONČIĆ 2	LIGNIN [%] - SREDNJA VRIJEDNOST
početni uzorak	3,42	4,88	4,15 ± 1,03
1. dan	4,22	5,13	4,68 ± 0,64
10. dan	3,45	5,40	4,42 ± 1,35
20. dan	6,63	8,53	7,58 ± 1,35
30. dan	7,90	9,63	8,77 ± 1,23

Usporedba sinter lončića označenih s brojevima 1 i 3 za uzorak repinih rezanaca fermentiranih s *T. vesicolor* u aerobnom bioreaktoru prikazan je u **Tablici 7**.

Tablica 7: Udio lignina u uzorcima repinih rezanaca tijekom procesa fermentacije s *T. vesicolor* u aerobnom bioreaktoru i filtriranih preko sinter lončića 1 i 3, prema broju uzoraka $n = 1$

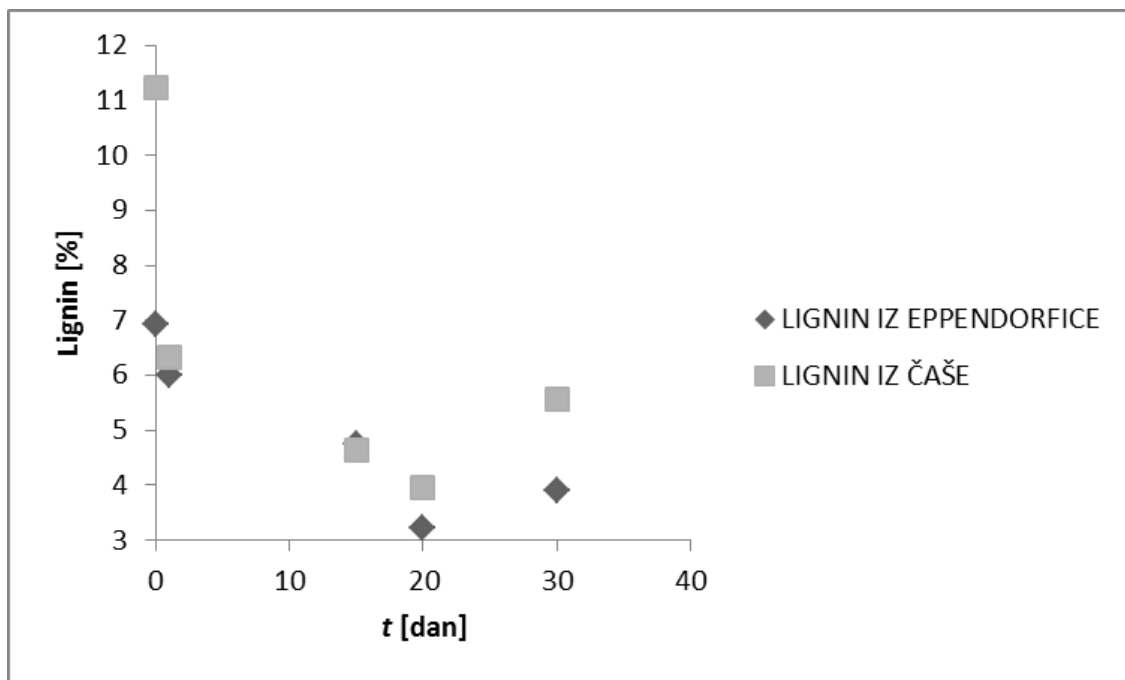
UZORCI	LIGNIN [%] - SINTER LONČIĆ 1	LIGNIN [%] - SINTER LONČIĆ 3	LIGNIN [%] - SREDNJA VRIJEDNOST
početni uzorak	3,42	6,93	$5,17 \pm 2,49$
1. dan	1,32	5,99	$3,65 \pm 3,30$
15. dan	4,76	16,69	$10,72 \pm 8,44$
20. dan	3,22	9,42	$6,32 \pm 4,38$
25. dan	5,24	13,31	$9,27 \pm 5,71$
30. dan	2,28	3,91	$3,10 \pm 1,15$

Sinter lončići se obilježavaju različitim brojevima od 0 do 6, prema njihovom različitom porozitetu. Manji broj označava veće pore sinter lončića. Prema proizvođačkoj specifikaciji (www.duran-group.com) sinter lončići označeni s brojem 1 imaju maksimalnu veličinu pora $100 - 160 \mu\text{m}$, lončići označeni s brojem 2 imaju maksimalnu veličinu pora $40 - 100 \mu\text{m}$, a lončići označeni s brojem 3 maksimalnu veličinu pora $16 - 40 \mu\text{m}$. Sinter lončići označeni s brojem 1 imaju najveće pore, dok kod lončića označenog brojem 3 je dolazilo do začepjenja pora zbog zaustavljanja spora mikroorganizma. Prema rezultatima prikazanim u **Tablicama 6 i 7** standardna devijacija za filtrirane uzorke je u rasponu između 0,64 i 1,35 za usporedbu sinter lončića označenih s 1 i 2, a za usporedbu sinter lončića označenih s 1 i 3 standardna devijacija je znatno veća i nalazi se u rasponu od 1,15 do 8,44.

Pretpostavlja se da su uzorci rađeni u sinter lončićima označeni s brojem 3 nepouzdaniji od onih rađenih u lončićima označenih s brojevima 1 i 2.

4.3. USPOREDBA POSTUPKA HIDROLIZE

S ciljem pronalaska zadovoljavajuće metode određivanja lignina, u procesu kiseline hidrolize uzorka provedena je usporedba postupka hidrolize u Eppendorf tubicama i staklenim čašama od 50 mL kod uzoraka repinih rezanaca koji su biološki obrađeni u bioreaktoru. Usporedba je provedena za početni uzorak, te za 1., 15., 20., i 30. dan fermentacije.



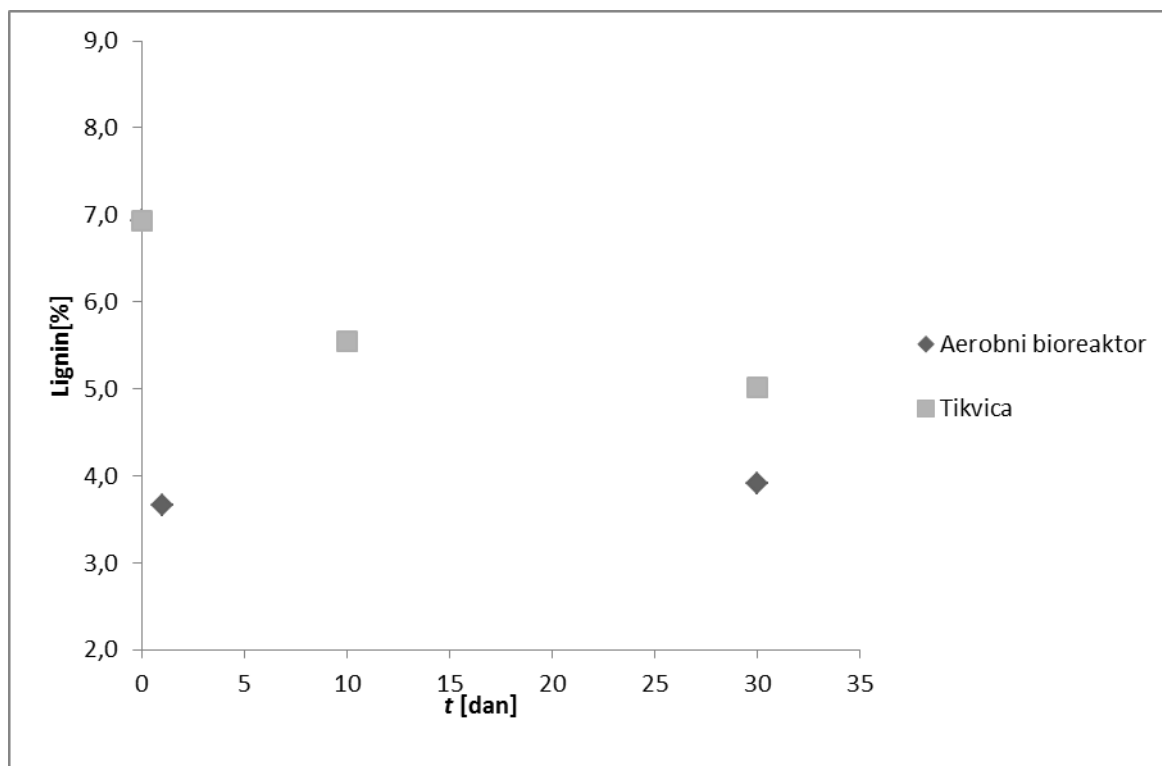
Slika 7: Usporedba postupka hidrolize u Eppendorf tubici i staklenoj čaši od 50 ml za uzorak repinih rezanaca fermentiranih s *T. vesicolor* u aerobnom reaktoru

U staklenim čašama, uzorci su ručno miješani s kiselinom pomoću staklenog štapića. Količina uzorka zajedno sa kiselinom je vrlo mala u odnosu na veličinu čaše, stoga je uzorak bilo vrlo teško potpuno otopiti u kiselini, što je i vidljivo iz dobivenih rezultata prikazanih na **Slici 7**. Odstupanja u mjerenjima između ova dva postupka su bila manja u uzorcima nakon početne faze fermentacije (1. i 15. dan.) u odnosu na uzorke nakon 20. i 30. dana fermentacije. Eppendorf tubica je znatno manja i ima poklopac, te se uzorak miješao sa kiselinom pomoću vrtložne miješalice (Vortex), prilikom čega je došlo do potpunog otapanja uzorka u kiselini. Drugi razlog bolje hidrolize uzorka u Eppendorf tubicama je i veća dodirna površina uzorka

u tubici sa toplom vodom tijekom jednosatnog kuhanja, u odnosu na dodirnu površinu staklene čaše.

4.4. USPOREDBA POSTUPKA FERMENTACIJE U AEROBNOM BIOREAKTORU I LABORATORIJSKOJ STAKLENCI

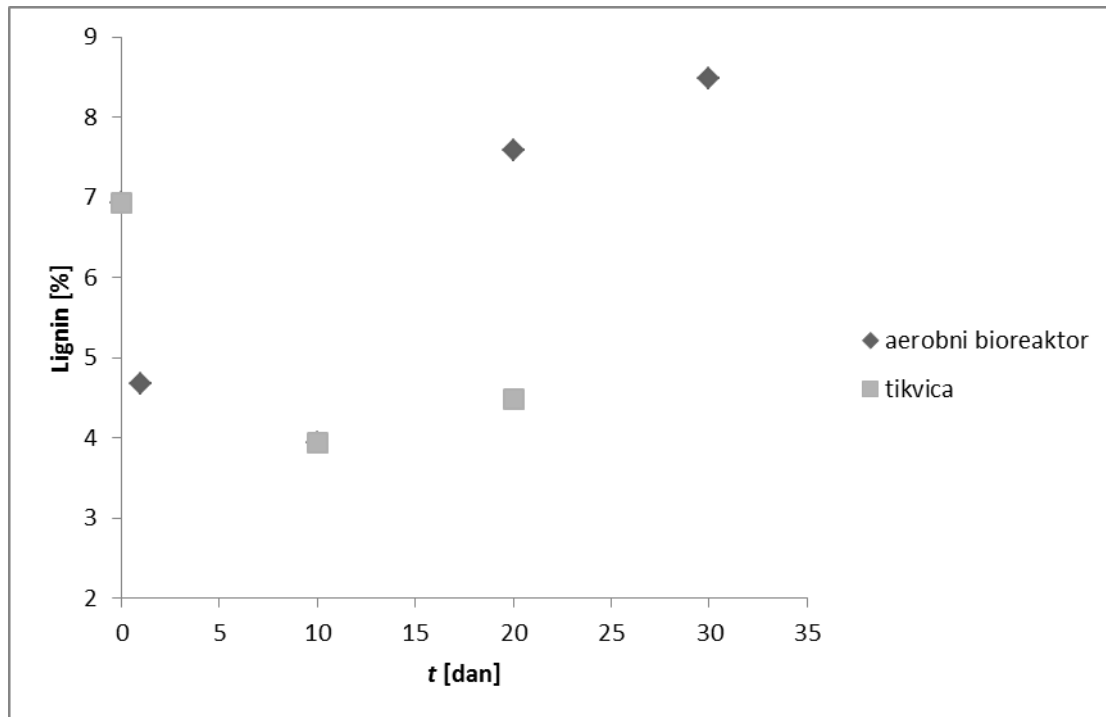
Uspoređivani su rezultati udjela lignina u pokusima aerobne obrade repinih rezanaca u staklenkama i bioreaktoru. Rezultati pokusa s *T. versicolor* su prikazani na **Slici 8.**, a rezultati pokusa s *P. chrysosporium* na **Slici 9.** Kako je i bilo za očekivati, dodatna aeracija primijenjena u bioreaktoru, utjecala je na unaprijeđenje procesa razgradnje lignina. Tako je konverzija lignina u pokusu s *T. versicolor* u bioreaktoru iznosila 43,58%, a u laboratorijskoj staklenci 27,66%



Slika 8: Usporedba postupka fermentacije u aerobnom bioreaktoru i tikvici za uzorak repinih rezanaca fermentiranih s *T. versicolor*

Kod pokusa biološke obrade s *P. chrysosporium*, u oba eksperimenta najveća konverzija je postignuta nakon 10 dana (43,29% za oba uzorka). Daljnjim trajanjem procesa u oba slučaja

dolazi do porasta udjela lignina. Razlog tome je vjerojatno intenzivan rast mikroorganizama uz produkciju spora koje se vežu na supstrat, te utječu na kvantifikaciju lignina, budući da se udio lignina određivao gravimetrijskom metodom.



Slika 9: Usporedba postupka fermentacije u aerobnom bioreaktoru i tikvici za uzorak repinih rezanaca fermentiranih s *P. chrysosporium*

4.5. UDIO CELULOZE U LIGNOCELULOZNIM SIROVINAMA

Udio celuloze određivan je u lignoceluloznim sirovinama prije i nakon fermentacije s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium* prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.4.3.** Kao lignocelulozne sirovine upotrebljavani su repini rezanci fermentirani u aerobnom bioreaktoru i laboratorijskoj staklenci, te piljevine bukve, cera i hrasta kitnjaka biološki obrađene u laboratorijskoj staklenci.

Tablica 8: Udio celuloze u uzorcima repinih rezanaca prije i nakon fermentacije u aerobnom bioreaktoru s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium*

UZORCI	CELULOZA %
početni uzorak	25,92
<i>T. vesicolor</i>	
1. dan	27,28
30. dan	29,25
<i>P.chrysosporium</i>	
1. dan	29,24
30. dan	28,64

Tablica 9: Udio celuloze u uzorcima repinih rezanaca prije i nakon fermentacije u laboratorijskim staklenkama s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium*

UZORCI	CELULOZA %
početni uzorak	25,92
<i>T. vesicolor</i>	
10. dan	30,20
30.dan	32,33
<i>P. chrysosporium</i>	
10. dan	23,69
20. dan	26,13

Udio celuloze za uzorke piljevina su određeni za početne uzorke i za uzorke fermentirane s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium* tijekom 45 dana, te za sljepe probe – uzorke piljevina podvrgnute jedankim uvjetima fermentacije bez dodanog mikroorganizma.

Tablica 10: Udio celuloze u uzorcima piljevine bukve prije i nakon fermentacije u laboratorijskim staklenkama s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium*

UZORCI	CELULOZA %
početni uzorak	41,25
45. dan fermentacije s <i>T. vesicolor</i>	44,07
45. dan fermentacije s <i>P. chrysosporium</i>	43,03
45. dan slijepa proba	42,95

Tablica 11: Udio celuloze u uzorcima piljevine cera prije i nakon fermentacije u laboratorijskim staklenkama s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium*

UZORCI	CELULOZA %
početni uzorak	36,30
45. dan fermentacije s <i>T. vesicolor</i>	35,51
45. dan fermentacije s <i>P. chrysosporium</i>	39,47
45. dan slijepa proba	37,88

Tablica 12: Udio celuloze u uzorcima piljevine hrasta kitnjaka prije i nakon fermentacije u laboratorijskim staklenkama s *T. vesicolor* i *P. chrysosporium*

UZORCI	CELULOZA %
početni uzorak	41,92
45. dan fermentacije s <i>T. vesicolor</i>	43,66
45. dan fermentacije s <i>P. chrysosporium</i>	43,92
45. dan slijepa proba	40,61

Kod svih uzoraka je primijećen blagi porast udjela celuloze u odnosu na početni udio. Razlog tome je vjerojatno intenzivan rast mikroorganizama uz produkciju spora koje se vežu na supstrat, te utječu na kvantifikaciju celuloze, budući da se udio celuloze određivao gravimetrijskom metodom. Prema ovim rezultatima može se zaključiti da sojevi *T. vesicolor* i *P. chrysosporium* korišteni u ovom istraživanju nisu proizvodili celulolitičke enzime potrebne za razgradnju celuloze.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobivenih tijekom ovog istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

T. vesicolor i *P. chrysosporium* korišteni tijekom ovog istraživanja proizvodili su ekstracelularne enzime odgovorne za razgradnju lignina iz piljevina bukve, cera i hrasta kitnjaka.

Najviše konverzije (X) lignina postignute su u eksperimentima provedenim s bukvom kao sustratom: $X = 8,23\%$ (*T. vesicolor*) i $X = 25,42\%$ (*P. chrysosporium*).

Iz dobivenih rezultata razgradnje lignina iz repinih rezanaca može se zaključiti da primijenjena metoda određivanja udjela lignina nije prikladna za određivanje udjela lignina kod supstrata koji imaju niski udio lignina, a obrađivani su biološkom metodom pomoću filamentoznih mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

Na osnovi rezultata dobivenih provedbom postupka određivanja lignina u sinter lončićima različitog poroziteta, gdje je standardna devijacija između sinter lončića 1 i 2 iznosila do 1,35, a između sinter lončića 1 i 3 čak do 8,44, te je tijekom filtracije preko sinter lončića 3 vrlo često dolazilo do začepljenja pora i nemogućnosti potpune filtracije, može se zaključiti da su sinter lončići 3, s veličinom pora 16–40 μm nepouzdati za određivanje udjela lignina.

Usporedbom utjecaja postupka kiselinske hidrolize tijekom određivanja lignina, pokazano je da se niži udio lignina, koji predstavlja bolje proveden postupak hidrolize, postiže upotrebom Eppendorf tubica.

Veća konverzija lignina iz repinih rezanaca postignuta je u bioreaktoru s aeracijom ($X = 43,58\%$, *T. vesicolor*) u odnosu na pokuse provedene u laboratorijskim staklenkama ($X = 27,66\%$, *T. vesicolor*). Biološkom obradom s *P. chrysosporium*, oba eksperimenta najveću konverziju su postigli nakon 10 dana ($X = 43,29\%$).

T. vesicolor i *P. chrysosporium* korišteni u ovom istraživanju nisu pokazali celulolitičku aktivnost.

6. POPIS LITERATURE

Antonović A: *Kemija drva I*. Šumarski fakultet, Zagreb, 2010.

Antonović A: *Kemija drva II*. Šumarski fakultet, Zagreb, 2008.

Benes I, Velić N, Planinić M, Šmogrović D, Tišma M: *Utilisation of Pentosans from Sugar Beet Pulp by Different White-Rot Fungi*. International Conference on Food Engineering and Biotechnology, Volume 50, 2013.

Bon EPS, Ferrara MA: *Bioethanol production via enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass*. Document prepared for "The Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries", an FAO seminar held in Rome, 1996.

Bourbonnais R, Paice MG, Reid ID, Lanthier P, Yaguchi M: *Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from Trametes versicolor and Role of the Mediator 2,29-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization*. Environmental microbiology 61 (5): 1876-1880, 1995.

Brodeur G, Yan E, Badal K, Collier J, Ramachandran KB, Ramakrishnan S: *Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass, review article*. SAGE-Hindawi Access to Research Enzyme Research. Volume 2011, Article ID 787532, p.17, 2011.

Cheilas T, Stoupis T, Christakopoulos P, Katapodis P, Mamma D, Hatzinikolaou DG, Kekos D, Macris BJ: *Hemicellulolytic activity of Fusarium oxysporum grown on sugar beet pulp. Production of extracellular arabinanase*. Process Biochemistry 35: 557–561, 2000.

Crestini C, Melone F, Sette M, Saladino R: *Milled wood lignin: a linear oligomer*. Biomacromolecules, 12, 3928-3935, 2011.

Čubel I: *Biorazgradnja otpada porijeklom iz prehrambene i šumarske industrije u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

Duraković S, Duraković L: *Mikologija u biotehnologiji*. Kugler, Zagreb, 2003.

Duraković S, Redžepović S: *Uvod u opću mikrobiologiju*. Kugler, Zagreb, 2002.

Duraković S: *Opća mikrobiologija*. Zagreb, 1996.

Fraser SJ: *Intraspecific comparison of Phanerochaete chrysosporium strains: peroxidase production, pollutant degradation and mycelial differentiation*. Doktorska disertacija, Rhodes University, Južnoafrička Republika, 2005.

Grba S: *Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji*. Plejada, Zagreb, 2010.

Grgić J: *Određivanje kemijskog sastava repinih rezanaca tijekom fermentacije s gljivom bijelog truljenja Phanerochaete chrysosporium*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

Hammel KE: *Fungal degradation of lignin*. In Cadisch G, Giller KE (eds) *Driven by nature: Plant litter quality and decomposition*. CAB International, Wallingford, pp 33–46, 1997.

Hutnan M, Drtil M, Mrafkova L: *Anaerobic biodegradation of sugar beet pulp*. Biodegradation 11: 203–211, 2000.

Iqbal HMN, Asgher M, Bhatti HN: *Optimization of physical and nutritional factors for synthesis of lignin degrading enzymes by a novel strain of Trametes vesicolor*. BioResources 6 (2): 1273-1287, 2011.

Janušić V, Ćurić D, Krička T, Matin A: *Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase*. Poljoprivreda, 14(1), 53-58, 2008.

Jozić I: *Određivanje kemijskog sastava repinih rezanaca tijekom fermentacije s plijesni Aspergillus niger*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.

Kirk TK, Farrell RL: *Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin*. Annual review of microbiology. 1: 465–505, 1987.

Lange H, Decina S, Crestini C: *Oxidative upgrade of lignin – recent routes reviewed*. European polymer journal 49, 1151-1173, 2013.

- Lankinen P: *Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi Agaricus bisporus and Phlebia radiata on lignocellulose-containing media*. Disertacija. University of Helsinki, Helsinki, 2004.
- Marić V: *Biotehnologija i sirovine*. Stručna i poslovna knjiga d.o.o., Zagreb, 2000.
- Mussatto SI, Teixeira JA: *Lignocellulose as raw material in fermentation processes*. Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, Braga, Portugal, 897–907, 2010.
- Nowak G, Matuszewska A, Nowak M: *Protein secretion and oxidase activities in idiophasic cultures of Trametes versicolor*. In: 7th International Conference of Biotechnology in the Pulp and Paper Industry p.B131-134, 1998.
- Ramus LP: *The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulostic materials*. Quim Nova, 26 (6), 863-871, 2003
- Saha BC: *Hemicellulose bioconversion*. Journal of industrial microbiology and biotechnology. 30 (5) 279-291, 2003.
- Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, Lesage-Meessen L, Levasseur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E: *Fungal strategies for lignin degradation*. Advances in botanical researches. 61, 263–308, 2012.
- Spagnuolo M, Crecchio C, Pizzigallo MDR, Ruggiero P: *Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp*. Bioresource Technology vol. 60: 215-222, 1997.
- Sun Y, Cheng J: *Hydrolysis of lignocellulostic materials for ethanol production: a review*. Bioresource Technology 83 :1-11, 2002.
- Teerapatsakul C, Parra R, Bucke C, Chitradon L: *Improvement of laccase production from Ganoderma sp. KU-Alk4 by medium engineering*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23 (11), 1519-1527, 2007.

- Tišma M, Velić N, Panjičko M, Zelić B: *Treatment of sugar beet waste in solid-state operating bioreactor*, Zbornik radova XIV. Ružičkini dani Danas znanost- sutra industrija / Jukić, A. (ur.), Zagreb i Osijek : Petrokemija, d.d., Kutina, str. 177-186, 2013.
- Tomić F, Krička T, Matić S: *Raspoložive poljoprivredne površine i mogućnost šuma za proizvodnju biogoriva u Hrvatskoj*. Šumarski list, 7-8, 323-330, 2008.
- US Department of energy Joint genome institute: *Phanerochaete chrysosporium* RP-78 v 2.2. <http://genome.jgi-psf.org/whiterot1/whiterot1.home.html> (21.06.2014.)
- Vertes AA, Qureshi N, Blaschek HP, Yukawa H : *Biomass to biofuels*. Wiley, West Sussex, 2010.
- Vidaković D: *Kemijska analiza teških metala u otpadnom drvu*. Završni rad. Šumarski fakultet, Zagreb, 2012.
- Xavier AMR, Tavares APM, Ferreira R, Amando F: *Trametes versicolor growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry*. Electronic Journal of Biotechnology 10 (3), 2007.