Projektiranje bioreaktora za uzgoj mikroorganizama na polučvrstim i čvrstim supstratima

Ćurković, Ivana

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:109:911356

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Ćurković

Projektiranje bioreaktora za uzgoj mikroorganizama na polučvrstim i čvrstim supstratima

DIPLOMSKI RAD

Osijek, travanj 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Optimizacija i projektiranje industrijskih procesa
Tema rada je prihvaćena na VIII sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 13.6.2013.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Darko Velić*
Komentor: doc. dr. sc. *Marina Tišma*

Projektiranje bioreaktora za uzgoj mikroorganizama na polučvrstim i čvrstim supstratima

Ivana Ćurković, 166/DI

Sažetak:
Fermentacije na čvrstim nosačima (eng. *Solid State Fermentations*, SSF) su procesi koji podrazumijevaju rast mikroorganizama na vlažnim čvrstim nosačima bez prisustva slobodne vode, pri čemu čvrsti nosači mogu ujedno biti i supstrati za rast, tzv. neinertni nosači. Jedan od primjera neinertnih nosača u SSF su različiti lignocelulozni materijali, pri čemu se SSF primjenjuje za mikrobiološku razgradnju ovih materijala. Lignocelulozni materijali predstavljaju važan obnovljivi izvor energije i kao otpad u velikim količinama nastaju u poljoprivrednoj, prehrambenoj i drvnoj industriji. Nadalje, ovi materijali zanimljivi su i kao potencijalna sirovina u biotehnološkoj proizvodnji, pri čemu najveći problem predstavlja teška razgradnja lignoceluloznih sastavnica (celuloze, hemiceluloze i lignina) do jednostavnih šećera. Fermentacije na čvrstim nosačima uspješno se primjenjuju za mikrobiološku razgradnju lignocelulozne biomase, pri čemu se kao radni mikroorganizam najčešeće koriste gljive bijelog truljenja koje imaju sposobnost razgradnje lignoceluloznih sastavnica do fermentabilnih šećera. U ovom radu, gljiva bijelog truljenja, *Trametes versicolor* uzgajana je na repinim rezancima kao čvrstom supstratu i nosaču u reaktorskom sustavu pri ambijentalnoj temperaturi tijekom 30 dana. Istraživan je utjecaj *T. versicolor* na razgradnju repinih rezanaca. Tijekom fermentacije praćene su promjene procesnih parametra (temperatura i relativna vlažnost u sustavu), kao i gubitak na masi lignoceluloznog supstrata te promjena boje i kemijskog sastava supstrata. Povećanje temperature i relativne vlažnosti u sustavu, kao i gubitak na masi supstrata od 21,33 % ukazuju na intenzivan rast i aktivnost radnog mikroorganizma. Nadalje, konverzija celuloze od 64,65 % i pentozana od 42,39 % nakon 30 dana uzgoja također ukazuju na aktivnost radnog mikroorganizma i produkciju enzima odgovornih za razgradnju lignoceluloznih sastavnica. Na osnovi provedenog eksperimenta i dobivenih rezultata projektiran je horizontalni bioreaktor s kombiniranim sustavom miješanja.

Ključne riječi: fermentacija na čvrstim nosačima, horizontalno-cilindrični stakleni reaktor, lignocelulozni materijal, projektiranje bioreaktora, *Trametes versicolor*

Rad sadrži: 57 stranice
25 slike
4 tablice
30 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	doc. dr. sc. *Natalija Velić,*	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Darko Velić,*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Marina Tišma,*	član-komentor
4.	izv. prof.dr. sc. *Mirela Planinić*.	zamjena člana

Datum obrane: 08. travanj 2014.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATETHESIS

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

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Optimization and design of industrial processes
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. VIII. held on June 13,2013.
Mentor: *Darko Velić*, PhD, associate prof.
Komentor: *Marina Tišma*, PhD, assistant prof.

Design of bioreactor for microorganisms cultivation in semi-solid and solid substrates

Ivana Ćurković, 166/DI

Summary:
Solid State Fermentation (SSF) is a process where the microorganisms are grown on moist solid substrates in the absence of free water, where the solid carrier can also be a substrate for the microorganism growth, so-called, non-reactive substrate. An example of non-reactive substrates in SSF are different lignocellulosic materials, where in the SSF is applied for the microbiological decomposition of these materials. Lignocellulosic materials represent an important renewable energy source occurring as waste in large quantities in the agricultural, food and timber industries. These materials, however,could have application in biotechnological production, but the biggest problem is the severe degradation of lignocellulosic components (cellulose, hemicellulose and lignin) to simple sugars. SSF is successfully applied for microbial degradation of the lignocellulose, where in white rot fungi are the most often used microorganisms. In this study white rot fungi, *Trametes versicolor* was cultivated on sugar beet pulp as a solid substrate and the carrier in the reactor at ambient temperature for 30 days. The possibility of *T. versicolor* to degrade beet pulp was investigated. During fermentation, the change of process parameters was observed (temperature and relative humidity in the system), as well as the loss of substrate mass,change of the color and chemical composition. Temperature and relative humidity in crease as well as the loss of substrate mass (21,33 %) indicate strong growth and the activity of working microorganisms. Furthermore, the conversion of cellulose 64.65 % and 42.39 % of pentosans after 30 days of cultivation also indicates the activity of working microorganism and production of enzymes responsible for degradation of lignocellulosic components. A horizontal bioreactor with combined interference system was designed based on obtained results.

Keywords: Bioreactor design , horizontal bioreactor, lignocellulosic materials, solid state fermentation, *Trametes versicolor*

Thesis contains: 57 pages
25 figures
4 tables
30 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Natalija Velić*, PhD, assistant prof.	chairperson
2.	*Darko Velić*, PhD, associate prof.	supervisor
3.	*Marina Tišma*, PhD, assistant prof.	member-cosupervisor
4.	*Mirela Planinić*, PhD, associate prof.	stand-in

Defense date: 08. april 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 svom mentoru dr. sc. Darku Veliću, izv. prof. na stručnom vodstvu, poticaju, pristupačnosti i savjetima prilikom izrade diplomskog rada. Zahvaljujem Vam se što ste strpljivo prenosili na mene svoje znanje i mudrost. Imali ste osobit utjecaj na mene, ukazujući na sve ono što jedan mag. ing. proc. treba biti.

Također se zahvaljujem svojoj komentorici dr. sc. Marini Tišmi, doc. i dr. sc. Nataliji Velić doc. na stručnim savjetima koji su uvelike pomogli pri izradi ovog rada.

Najtoplije se zahvaljujem svojim roditeljima koji su me bodrili i pomagali tijekom cijelog studija. Zahvaljujem im se što su me usmjerili da postanem osoba kakva sam danas. Hvala Ivanu i prijateljima na podršci koju su mi pružili.

Zahvaljujem svim svojim kolegicama i kolegama s kojima sam provela svoje studentske dane. Pružili ste mi veliku pomoć i davali korisne savjete tijekom studiranja. Vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali ste mi svojim prisustvom i pomogli da to vrijeme smatram najljepšim dijelom svog života.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA (SSF) 4

2.1.1. Provedba SSF procesa 5

2.1.2. Proizvodi i primjena SSF 7

2.2. LIGNOCELULOZNI MATERIJAL 9

2.2.1. Repini rezanci 10

2.3. GLJIVE 10

2.3.1. Gljive bijelog truljenja 11

2.3.1.1. *Trametes versicolor* 12

2.4. VRSTE KOMERCIJALNIH SSF BIOREAKTORA 13

2.5. PROJEKTIRANJE BIOREAKTORA 18

2.5.1. Konstrukcijski dijelovi bioreaktora i izbor konstrukcijskog materijala 18

2.5.2. Proračun debljine stjenke bioreaktora 18

2.5.3. Volumen bioreaktora 19

2.5.4. Masa bioreaktora 20

2.5.5. Projektiranje izmjenjivača topline 24

2.5.6. Miješanje i proračun snage potrebne za miješanje 27

2.5.7. Mjerenje i upravljenje 28

3. EKSPERIMENTALNI DIO 30

3.1. ZADATAK 31

3.2. MATERIJAL 31

3.2.1. Supstrat i radni mikroorganizam 31

3.2.2. Kemikalije 31

3.3. APARATURA 32

3.4. METODE 33

3.4.1. Priprema hranjive podloge za uzgoj radnog mikroorganizma 33

3.4.2. Uzgoj gljive bijelog truljenja *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima 33

3.4.3. Određivanje udjela vode termogravimetrijskom metodom 35

3.4.4. Određivanje udjela pepela 35

3.4.5. Određivanje udjela pentozana 36

3.4.6. Određivanje udjela celuloze 36

3.4.7. Određivanje boje uzorka 37

4. REZULTATI I RASPRAVA 39

4.1. RAZGRADNJA REPINIH REZANACA POMOĆU GLJIVE BIJELOG TRULJENJA *T. versicolor* U HORIZONTALNO-CILINDRIČNOM STAKLENOM REAKTORU I PRI UVJETIMA FERMNETACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA 40

4.1.1. Praćenje procesnih parametara tijekom eksperimenta u HBR 41

4.1.2. Određivanje udjela pepela, celuloze i pentozana u lignoceluloznom materijalu (supstratu) tijekom fermnetacije 44

4.2. HORIZONTALNI BIOREAKTOR S KOMBINIRANIM SUSTAVOM MIJEŠANJA 49

5. ZAKLJUČCI 52

6. LITERATURA 54

Popis oznaka, kratica i simbola

KRATICE

MnP	eng. *Manganese peroxidase* Mangan peroksidaza
LiP	eng. *Lignin peroxidase* Lignin peroksidaza
NAD^+	eng. *Nicotinamide adenine dinucleotide* Nikotinamid–adenin-dinukleotid
SSF	eng. *Solid state fermentation* Fermentacije na čvrstim nosačima
ORSTOM	fra. *Office de la recherche scientifique et technique outre-mer* Ured za znanstvena i tehnička istraživanjau inozemstvu
INRA	fra. *Institut national de larecherche agronomique* Nacionalni institut za istraživanje agronomije
SmF	eng. *Submerged fermentation* Submerzna fermentacija
AISI	eng. *American Iron and Steel Institute* Američki institut za željezo i čelik
SUF	eng. "*Scale-up*" *factor* "*Scale-up*" faktor
PLC	eng. *Programmable Logic Controller* Programabilni logički kontroler
DC	eng. *Direct current* Istosmjerni napon
DDC	eng. *Direct Digital Control* Direktno digitalno upravljanje
PDA	eng. *Potato dextrose agar* Krumpirov agar

1. UVOD

U proteklih nekoliko godina fermentacije na čvrstim nosačima ponovno se počinju značajnije upotrebljavati u znanosti, ali i pronalaze svoju primjenu u industriji (Durand, 2003), primjerice u proizvodnji hrane za ljude, goriva, životinjske hrane, te u proizvodnji industrijskih, kemijskih i farmaceutskih proizvoda. Nadalje, mogu se upotrebljavati u području obrade poljoprivrednog i industrijskog otpada pri čemu su, u odnosu na druge metode, ekološki i ekonomski prihvatljive metode (Pandey, 2003.).

Prilikom rasta u uvjetima fermentacija na čvrstim nosačima, mikroorganizmi rastu na vlažnim čvrstim supstratima bez prisustva slobodne vode.

Jedan od primjera čvrstih (neinertnih) nosača u SSF su različiti lignocelulozni materijali. Zbog svog kemijskog sastava imaju veliki potencijal za upotrebu u proizvodnji vrijednih biotehnoloških proizvoda. Složena kemijska struktura lignoceluloznog materijala, odnosno najvažnijih sastavnica celuloze, hemiceluloze i lignina, otežava njegovu razgradnju do jednostavnih šećera (Zheng i sur., 2012.). Gljive bijelog truljenja, koje imaju sposobnost razgradnje lignoceluloznih sastavnica do fermentabilnih šećera, se najčešće upotrebljavaju u ovu svrhu. One proizvode ekstracelularne lignolitičke enzime (mangan peroksidaze, lignin peroksidaze i lakaze) odgovorne za razgradnju celuloze, hemiceluloze i lignina (Tišma i sur., 2013.).

U ovom radu, gljiva bijelog truljenja, *Trametes versicolor* uzgajana je na repinim rezancima kao čvrstom supstratu i nosaču u laboratorijskom reaktorskom sustavu pri ambijentalnoj temperaturi tijekom 30 dana. Cilj rada bio je istražiti mogućnost primjene gljive bijelog truljenja u razgradnji repinih rezanaca u horizontalno – cilindrično staklenom reaktoru te na osnovi rezultata istraživanja projektirati bioreaktor u većem, poluindustrijskom mjerilu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Fermentacije na čvrstim nosačima (eng. *„Solid state fermentation“,* SSF) su procesi u kojima mikroorganizmi rastu na vlažnim čvrstim nosačima, koji pri tom mogu biti i supstrati za rast mikroorganizama. Mikroorganizmi mogu rasti na površini, između te u samom matriksu supstrata/nosača. Prostor između supstrata/nosača, u većini, ispunjava plinovita faza zajedno s kapljevitom fazom koja može biti u obliku tankog filma na površini ili u obliku kapljica između supstrata/nosača. Većina kapljevite faze u sustavu je apsorbirana u čvrstom matriksu, pri čemu se održava aktivitet vode koji osigurava pravilan rast i metabolizam stanica radnog mikroorganizma (Mitchelli sur., 2006.). Čvrsti nosači, koji mogu biti biorazgradivi (ne-inertni) ili inertni (služe samo kao nosač, ali ne kao supstrat), imaju veliku površinu po jedinici volumena koja se kreće u rasponu od 10^3 do 10^6 m^2/m^3. Mehanička svojstva nosača trebaju biti takva da mogu izdržati kompresiju prilikom miješanje tijekom procesa fermentacije. To zahtijeva granulirane ili vlaknaste čestice, koje se teže razgrađuju ili lijepe jedna za drugu (Raimbault, 1998.).

SSF se provode šaržno i često se kao nosači u procesu koriste otpadni produkti ili nusprodukti iz poljoprivrede, šumarstva, prehrambene proizvodnje i sl. Ovi se materijali razvrstavaju s obzirom na prikladnost za rast odabranog radnog mikroorganizma i oblikovanje željenog proizvoda. U takav otpad i nusproizvode ubrajaju se mekinje pšenice i riže, kolač od prešanog ulja (pogača), komine jabuka i grožđa, kore banana, citrusa, ljuske kave, melasa šećerne repe itd. Ponekad se koriste i visokovrijedni prehrambeni materijali, kao što su krmna repa, riža, manioka itd.(Mitchell i sur., 2006., Vandenberghe i sur., 2004.).

U odnosu na češće korišten dubinski ili submerzni (eng. *Submerged fermentation*, SmF) način uzgoja, SSF proces ima svoje prednosti (relativna otpornost na kontaminaciju mikroorganizmima, veća produktivnost procesa, manja potrošnja energije za vođenje procesa, jednostavnija obrada otpada i dr.) i nedostatke (otežano mješanje čvrstog supstrata, teža kontrola temperature, automatizacije i dr.) (Pejin, 2003.). U **Tablici 1** dan je pregled prednosti i nedostataka SSF u odnosu na SmF (Raimbault, 1998.).

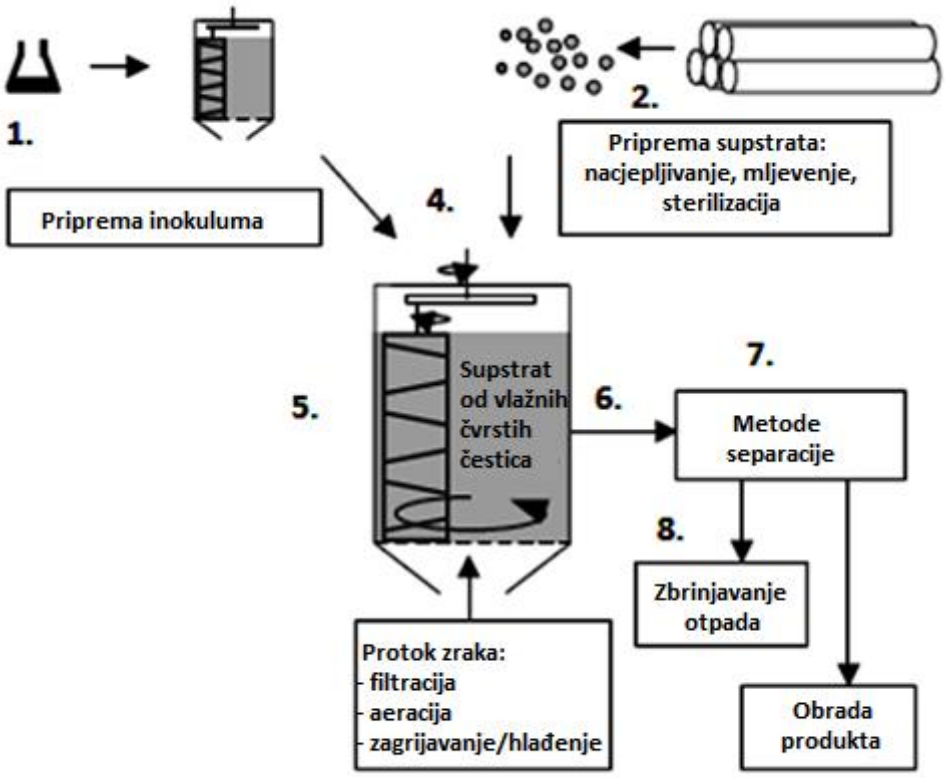
Tablica 1 Usporedba SmF i SSF

Čimbenici	SmF	SSF
Supstrati	Otopljeni šećeri	Polimerne netopive površine Škrob, celuloza, pektini, lignin
Aseptični uvjeti	Zahtjevana (visoka) aseptičnost procesa i kontrola sterilnosti	Teška kontrola sterilnosti
Voda	Velika potrošnja vode	Smanjena potrošnja vode
Kontrola temperature	Jednostavno kontroliranje temperature	Složeno kontroliranje temperature
Aeracija	Održavanje potrebne koncentracije otopljenog kisika	Teško osiguravanje potrebne količine kisika
Kontrola pH	Jednostavna kontrola pH	Teško održavanje konstantnog pH zbog čvrstih supstrata
Mehanička uznemirenja	Dobra homogenizacija	Preferiraju statičke uvjete
Uvećanje procesa	Jednostavniji, komercijalno dostupna oprema	Teži, ne postoji puno komercijalno dostupne opreme
Inokulacija	Jednostavna inokulacija	Inokulacija sporama
Kontaminacija	Manji rizik, uglavnom kontaminacija bakterijama	Velik rizik od kontaminacije, posebno plijesnima
Potrošnja energije	Velika potrošnja energije	Mala potrošnja energije
Kapacitet opreme	Veliki volumeni i visoka cijena tehnologije	Mali volumeni i niski troškovi opreme
Otpadna voda i onečišćenja	Velike količine otpadne vode	Nema otpadne vode, smanjena količina otpada

2.1.1. Provedba SSF procesa

Opći koraci SSF procesa su:

1. Priprema inokuluma;
2. Priprema supstrata;
3. Priprema bioreaktora;
4. Inokulacija i punjenje;
5. Kontrola i upravljanje;
6. Pražnjenje;
7. Metode separacije;
8. Zbrinjavanje otpada (**Slika 1**).



Slika 1 Opći koraci SSF procesa (Mitchelli sur., 2006.)

1. Priprema inokuluma

Vrsta i način pripreme inokuluma ovisi o radnom mikroorganizmu. Većina SSF procesa provodi se upotrebom filamentoznih gljiva kao radnog mikroorganizma. Cilj ovog koraka je uzgojiti inokulum dostatne količine i visoke mikrobiološke aktivnosti.

2. Priprema supstrata

Za postizanje odgovarajuće veličine čestica, supstrat je često potrebno usitniti, samljeti i granulirati. Pri tome odabir metode ovisi o zahtijevanoj veličini čestica supstrata. Po potrebi je supstratu potrebno dodati vodu i hranjive tvari (sastojci sa N i P) ili se može provesti kuhanje supstrata čime se povećava dostupnost hranjivih tvari. Supstrat se može sterilizirati ili pasterizirati izvan bioreaktora, iako je poželjnije sterilizaciju provesti unutar bioreaktora u kojem će se provoditi proces.

3. Priprema bioreaktora

Bioreaktor mora biti detaljno očišćen nakon prethodne fermentacije te steriliziran prije dodavanja supstrata ili se pak sterilizacija supstrata može provoditi unutar bioreaktora. Navedeno se provodi s ciljem sprječavanja kontaminacije supstrata tijekom SSF procesa.

4. Inokulacija i punjenje bioreaktora

Inokulacija se može provesti prije ili nakon punjenja bioreaktora. Ako se sloj supstrata ne može miješati u samom bioreaktoru, inokulacija se provodi izvan bioreaktora, a ako se supstrat može miješati, tada je postupak inokulacije najbolje provest raspršivanjem iznad sloja supstrata prije miješanja. U slučaju da se podloga pasterizira/sterilizira te inokulira izvan bioreaktora, samu inokulaciju je potrebno provesti uz veliku pažnju kako bi se spriječio ili smanjio unos kontaminanata.

5. Kontrola i upravljanje procesom

Pojedinosti ovise o vrsti bioreaktora u kojem se proces provodi, međutim,opći zadatak je podesiti procesne varijable, poput protoka i temperature ulaznog zraka, brzine miješanja, temperature rashladne vode, kako bi se osigurala optimalna temperatura procesa i odgovarajući aktivnitet vode s ciljem proizvodnje željenog produkta.

6. Pražnjenje bioreaktora

U nekim se slučajevima izdvajanje proizvoda može provoditi u samom bioreaktoru, iako se najčešće provodi izvan bioreaktora. Na kraju procesa, bioreaktor se prazni.

7. Metode izdvajanja proizvoda

Ovisno o tome je li proizvod ekstracelularni ili intracelularni metabolit, fermentirani supstrat s biomasom ili samo fermentirani supstrat, odabrat će se odgovarajuća metoda izdvajanja proizvoda.

8. Zbrinjavanje nastalog otpada

Upotrebom SSF procesa sprečava se odlaganje krutih organskih materijala u okoliš, čime se smanjuje njihov utjecaj te se njihovom upotrebom postiže manja emisija štetnih plinova i otpadnih tvari (Mitchell i sur., 2006.).

2.1.2. Proizvodi i primjena SSF

SSF procesi koriste se za proizvodnju niza važnih biotehnoloških produkata poput hrane, goriva, krmiva, različitih kemijskih i farmaceutskih pripravaka. Ova tehnologija istraživana je i korištena stoljećima, pri čemu je, do sada, najveću primjenu našla u proizvodnji tradicionalnih prehrambenih proizvoda kao što su:

- *Tempeh*, koji uključuje uzgoj *Rhizopus oligosporus* na kuhanoj soji.
- *Koji*, faza proizvodnje sojinog umaka, koja uključuje uzgoj *Aspergillus oryzae* na kuhanoj soji.

- *Ang-kak*, odnosno "crvena riža", uključuje uzgoj *Monascus purpureus* na kuhanoj riži (Mitchell i sur., 2006.).

U posljednja tri desetljeća došlo je do ponovnog interesa za primjenom SSF te posljedično povećanja broja proizvoda dobivenih primjenom ove tehnologije. Neki od proizvoda dobivenih primjenom SSF su:

- enzimi kao što su amilaze, lipaze, proteaze, pektinaze, celulaze;
- pigmenti;
- arome i spojevi okusa
- organske kiseline, kao što su oksalna kiselina, limunska kiselina i mliječna kiselina;
- giberelinska kiseline (hormon rasta biljaka);
- proteinizirana krmiva;
- krmiva poboljšane probavljivosti;
- antibiotici, kao što su penicilin i oksitetraciklin;
- biološki agensi (Mitchell i sur., 2006., Wang i sur., 2010.).

Daljni razvoj SSF usmjeren je u velikoj mjeri na njihovu moguću primjenu u zaštiti okoliša, odnosno procese bioremedijacije, razgradnje različitih onečišćujućih tvari – primjerice ksenobiotika, biološku detoksikaciju poljoprivredno-industrijskih ostataka, biotransformaciju bilja i ostataka usjeva za obogaćivanje prehrane, kompostiranje i sl. SSF tehnologija se sve više koristi i u području proizvodnje biogoriva i za potencijalno smanjenje troškova proizvodnje goriva (Pandey, 2002.,Wang i sur., 2010.). Osim primjene SSF u zaštiti okoliša, važan razvojni pravac je i proizvodnja produkata s dodanom vrijednošću kao što su biološki aktivni sekundarni metaboliti, uključujući antibiotike, alkaloide, biljne faktore rasta, enzime, organske kiseline, biopesticide, biogorivo, tvari arome itd.

Veliko ograničenje široj komercijalnoj primjeni SSF do sada je bila nedostupnost odgovarajuće procesne opreme za provođenje ovih procesa. Na tom se polju sve više napreduje te se počinju projektirati sustavi za proizvodnju kako u malom mjerilu, za proizvode visoke vrijednosti, kao šta su biofarmaceutici, tako i sustavi za proizvodnju u većem mjerilu (Pandey, 2002.,Wang i sur., 2010.).

2.2. LIGNOCELULOZNI MATERIJAL

Posljednjih godina nastaje sve veća količina lignocelulozno materijala. Velika količina nastaje u poljoprivrednoj, prehrambenoj i drvnoj industriji. Ovakav "zeleni otpad" većinom se spaljuje i nema značajnu primjenu u industriji i poljoprivredi te njegov potencijal ostaje neiskorišten. Zbog svog kemijskog sastava lignocelulozni materijali imaju veliki potencijal kao supstrati za upotrebu u proizvodnji vrijednih biotehnoloških proizvoda. Složena kemijska struktura lignocelulozno materijala, odnosno njegovih najvažnijih sastavnica, otežava njegovu razgradnju na jednostavne šećere (Zheng i sur., 2012.).

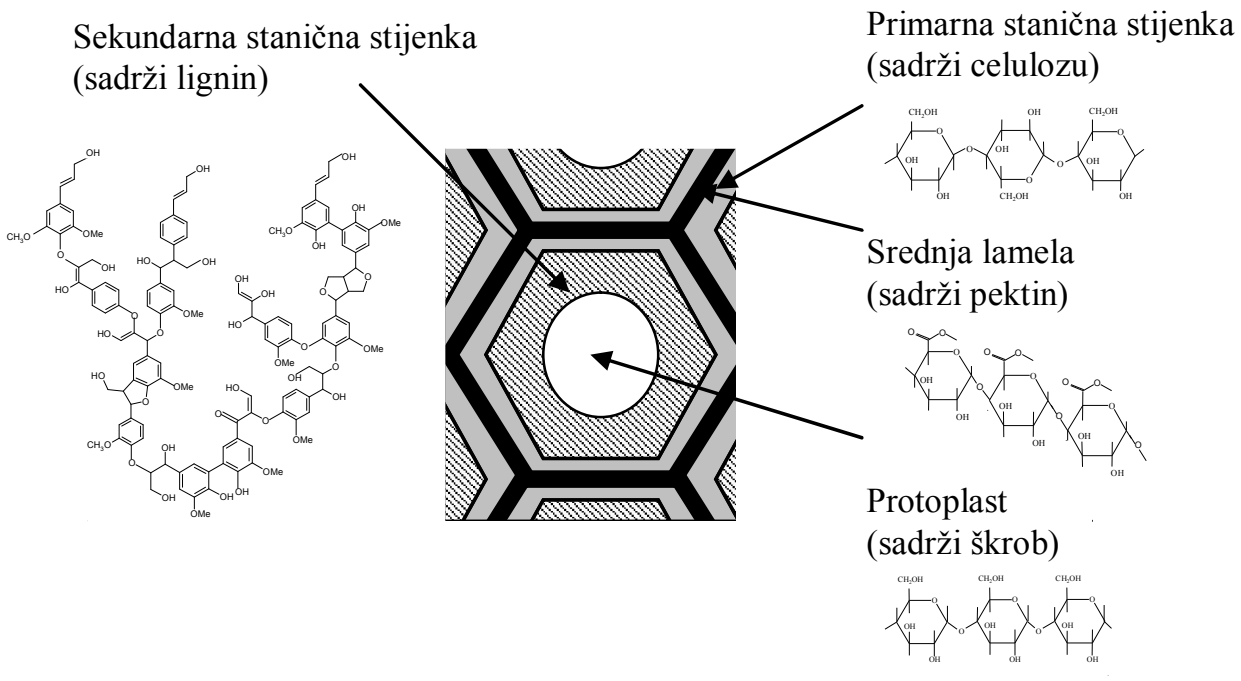
Osnovne lignocelulozne sastavnice svih lignocelulozno materijala su celuloza, hemiceluloza i lignin. Ovisno o vrsti i podrijetlu lignocelulozno materijala, udjeli ovih sastavnica variraju. Na **Slici 2** dan je prikaz kemijskog sastava drveta i strukture pojedinih lignocelulozno sastavnica.

Celuloza je, u većini slučajeva, najzastupljenija polimerna organska tvar u biljkama te predstavlja osnovni strukturni sastojak stanične stjenke. Celuloza ima kemijsku formulu $(C_6H_{10}O_5)_n$ te je građena od jedinica D-glukoze koji su povezane β (1,4) glikozidnom vezom. Netopiva je u vodi i organskim otapalima. Nakon proizvodnje različitih proizvoda (papir, vlakna, aditivi itd.) zaostala celuloza se pomoću mikrobnih procesa koristi u proizvodnji bioetanola i proteinskih krmiva.

Hemiceluloza pripada grupi heterogenih polisaharida koji se sintetiziraju biosintetskim putovima različitim od onih za sintezu celuloze. Za razliku od celuloze, hemiceluloza ima drugačiji broj jedinica glukoze, dužinu i grananje lanca. Glavni lanac može biti izgrađen samo od jedne vrste šećera (homopolimer) ili više vrsta (heropolimer) kao što su pentoze, heksoze, heksauronske kiseline i deoksiheksoze. Lako se hidrolizira pomoću razrijeđenih kiselina i lužina.

Lignin je polimerna organska tvar, koja je uz celulozu, jedna od najzastupljenijih u biljkama. Lignin štiti drvo od bolesti i truljenja uzrokovanog mikroorganizmima djelujući kao učvršćujuća komponenta koja povezuje stanice i štiti unutrašnju stranu staničnog zida drva. Pod ligninom se podrazumjeva amorfna trodimenzionalna netopljiva visokomolekularna mreža polimera fenilpropanskih podjedinica kumarilnog, koniferilnog i sinapilnog alkohola.

Enkapsulirajući celulozu, zajedno s hemicelulozom stvara amorfan kompleks. Lignin je teže razgradiv radi svojih aromatskih prstena. Netopljiv je u kiselinama i organskim otapalima (Janušić i sur., 2008.).



SLIKA 2 Kemijski sastav lignoceluloznog materijala (drveta) (Tišma i sur., 2013.)

2.2.1. Repini rezanci

Repini rezanci kao nusproizvod u industriji šećerne repe proizvodi se godišnje u velikim količinama. Samo se u Europi preradi godišnje 10^8 tona repe (Hutnan i sur., 2000). U nekim zemljama upotrebljava se kao stočna hrana dok se u drugim zemljama baca na odlagališta smeća. Preradom jedne tone repe dobije se oko 250 kg iscijeđenih prešanih repinih rezanaca sa sadržajem vode od oko 75-80 % te se također od iste količine može dobiti oko 70 kg repinih rezanaca s oko 10 % vode. Prosječan sastav repinih rezanaca je sljedeći: 22-30% celuloze, 24-32 % hemiceluloze, 24-32 % pektina i 3-4 % lignina (Hutnan i sur., 2000). Nadalje, repini rezanci sadrže velike količine galakturonske kiseline i arabinoze.

Zbog svog sastava, izuzetno su pogodni za biološku razgradnju, odnosno kao sirovina za biotehnološku proizvodnju. Jedna od mogućnosti korištenja repinih rezanaca je kao supstrata za anaerobnu fermentaciju, pri čemu nastaje bioplin (Hutnan i sur., 2000).

2.3. GLJIVE

Mikologija je znanost koja se bavi proučavanjem gljiva. Oko 80 000 do 120 000 vrsta gljiva su opisane do danas, iako se procjenjuje da je ukupan broj vrsta oko 1,5 milijuna (Webster i Weber, 2007.). Gljive su eukariotski heterotrofni organizmi koji sadrže polisaharid hitin u staničnoj stijenci i mogu živjeti kao paraziti, saprofiti i simbionti. Mogu biti jednostanični mikroorganizmi (kvasci) i višestanični mikroorganizmi (plijesni i makroskopske ili više gljive).

Dobro rastu na tamnim i vlažnim mjestima te na svim mjestima gdje je prisutan organski materijal. Uglavnom za rast zahtijevaju blago kisele supstrate, odnosno acidofilni su organizmi. Zajedno s bakterijama sudjeluju u razgradnji organskih tvari u okolišu, ali mnoge imaju i važnu komercijalnu ulogu u proizvodnji hrane (piva, vina, fermentiranih mliječnih proizvoda) i antibiotika.

Svaka gljiva pripada jednoj od pet taksonomskih skupina (razreda) koji se razlikuju prema vrsti spora, morfologiji hifa i spolnom ciklusu. Te su skupine: *Deuteromycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* i *Oomycetes*. Za identifikaciju i klasifikaciju gljiva potrebno je poznavati način razmnožavanja gljiva, tip micelija, i nastanak staničnih struktura (Webster i Weber, 2007.).

2.3.1. Gljive bijelog truljenja

Od svih poznatih vrsta gljiva samo nekolicina posjeduje sposobnost razgradnje drva (gljive truležnice). Ove gljive pripadaju razdjelima *Basidiomycota i Ascomycota*. Tri su glavne vrste gljiva koje razgrađuju drvo: gljive mekog truljenja, gljive smeđeg truljenja i gljive bijelog truljenja, a podjela se temelji na karakteristikama drva i nastalim razgradnim produktima (**Slika 3**).

Gljive bijelog truljenja najčešće uzrokuju truljenje drveta, jer imaju sposobnost razgradnje i mineralizacije glavnih komponenti drva: celuloze, hemiceluloze i lignina. Ova skupina obuhvaća velik broj gljiva, uglavnom *Basidiomycota*. Ovisno o vrsti gljive bijelog truljenja postoje dva načina razgradnje: simultana razgradnja svih navedenih komponenti polimera u drvetu i selektivna razgradnja, pri kojoj dolazi do razgradnje lignina, dok celuloza i hemiceloloza ostaju uglavnom nerazgrađene. Simultanu (istovremenu) razgradnju uzrokuje veći broj različitih fungalnih enzima postupno razgrađujući staničnu stjenku od lumena prema središnjoj lameli.

Predstavnici ove skupine su primjerice vrste *Trametes versicolor* i *Phanerochaete chrysosporium*. *Ceriporiopsis subvermispora* i *Dichomitus squalens* su primjeri vrsta koje provode selektivnu razgradnju drvne biomase (Tišma i sur., 2013.).

Kod gljiva bijelog truljenja u razgradnji lignina sudjeluju:

- ekstracelularni lignolitički enzimi kao što su mangan peroksidaze (MnP), lignin peroksidaze (LiP) i lakaze;
- drugi enzimi kao što su glioksaloksidaza, aril alkohol oksidaza, veratil alkohol oksidaza, oksalat dekarbosilaza, NAD^+ ovisne formijat dehidrogenaza i p450 monooksigenaza;

- ekstracelularni metaboliti kao što su fenolni i drugi aromatski spojevi, organske kiseline, nisko molekularni peptidi, metalni ioni i reaktivni kisikovi spojevi (Hatakka, 1994.).

Procesi proizvodnje pulpe u industriji papira, bioizbjeljivanje pulpe drveta te proizvodnje enzima (celulaze, ksilanaze) su industrijski procesi koji uključuju gljive bijelog truljenja i njihove lignolitičke enzime (Tišma i sur., 2013.). Također, imaju sve češću primjenu u uklanjanju različitih sintetskih boja pri obradi otpadnih voda te u bioremedijaciji pri razgradnji ksenobiotika (Wesenberg i sur., 2003).



SLIKA 3 Razgradnja drveta gljivama bijelog truljenja (*http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Whiterot.jpg*) [30.01.2014.]

2.3.1.1. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor (**Slika 4**) nazvana i „puranov rep“ je gljiva bijelog truljenja i spada u razred *Basidiomycota*. Raste u nakupinama, redovima ili preklapajućim formacijama na deblima, stabljikama i otpalim granama mrtvog i raspadajućeg drveća.

T. versicolor proizvodi tri lignolitička enzima (MnP, LiP i lakazu) te celulazu i avicelazu. Ima sposobnost učinkovite razgradnje lignina, policikličkih aromatskih ugljikovodika, različitih polikloriranih bifenila i niza sintetičkih boja. *T. versicolor* ima najveću primjenu u industriji pulpe i papira, budući da uspješno provodi delignifikaciju, izbjeljivanje i omekšavanje pulpe (Xavier i sur., 2007).



Slika 4 Prikaz gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor*

2.4. VRSTE KOMERCIJALNIH SSF BIOREAKTORA

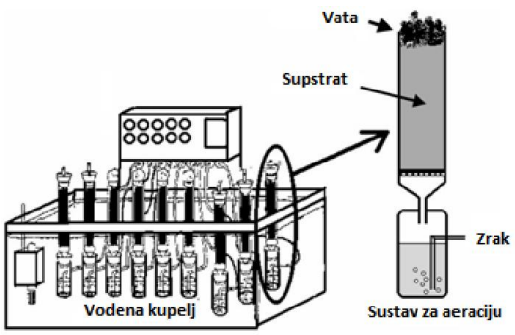
Postoje dvije skupine bioreaktora za SSF procese:

1. Bioreaktori u laboratorijskom mjerilu (laboratorijski bioreaktori),
2. Bioreaktori u poluindustrijskom mjerilu (poluindustrijski bioreaktori).

Prva skupina obuhvaća različite izvedbe, manje ili više sofisticirane,dok je druga skupina, koja se koristi uglavnom, na industrijskoj razini, znatno manje raznolika (Durand, 2002.).

1. Bioreaktori u laboratorijskom mjerilu ili laboratorijski bioreaktori

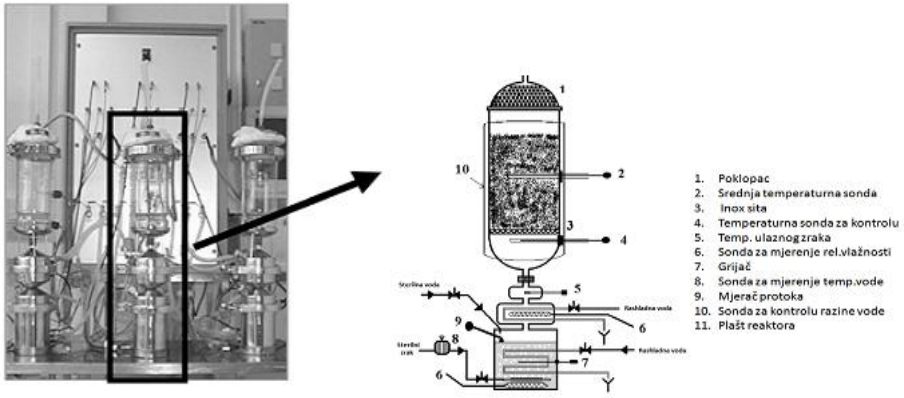
U ovoj skupini bioreaktora koristi se različita laboratorijska oprema. Petrijeve zdjelice, staklenke, Erlenmeyer tikvice, Roux boce i valjak boce, čija je prednost jednostavnost izvedbe i rukovanja s njima. Nema prisilne aeracije i miješanja, već se samo regulira temperatura okoline.



Slika 5 Sustav cijevnih reaktora

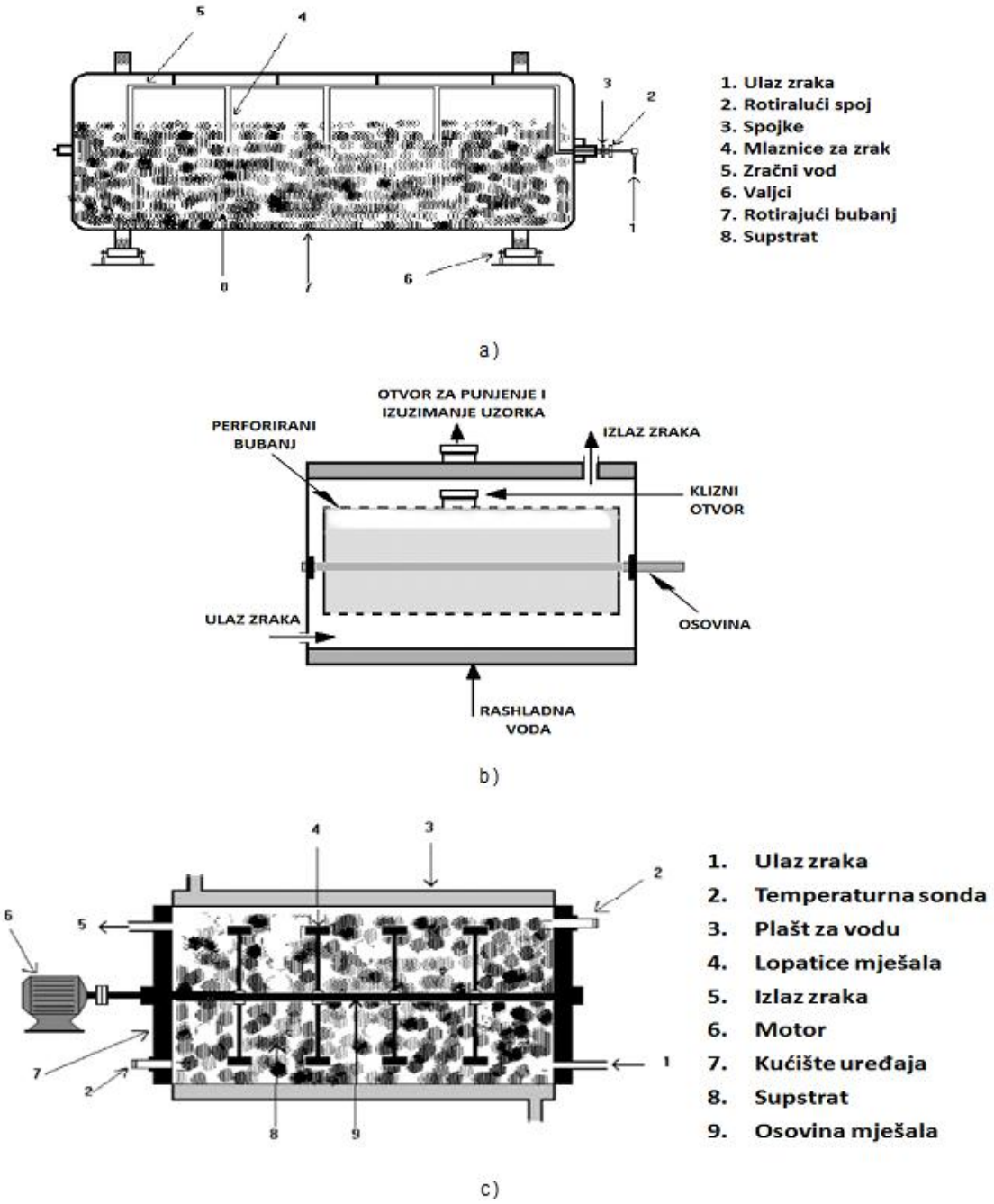
Laboratorijski cijevni reaktor (razvijen i patentiran od strane tvrtke ORSTOM) sastoji se od malih stupaca (promjera 4 cm, dužine 20 cm) ispunjenih medijem prije inokulacije te postavljenih u termostatiranu vodenu kupelj (**Slika 5**). Voda zasićena zrakom prolazi kroz svaki stupac. Kontrola procesa (praćenje mikrobnog rasta) omogućena je spajanjem stupca na plinski kromatograf s automatiziranim sklopom.

U novu generaciju malih laboratorijskih reaktora ubraja se i reaktor razvijen u Francuskoj u tvrtci INRA-club (**Slika 6**). Radni volumen ovog reaktora je oko 1 L. U usporedbi s tipičnim cijevnim reaktorom, glavne promjene su uvođenje sonde za mjerenje relativne vlažnosti zraka, oprema za hlađenje zraka i dodatni plašt za grijanje reaktora. Ove promjene poboljšavaju regulaciju protoka vode tijekom procesa. Svaki reaktor automatski je upravljan putem računala. Osim toga, uzorku se može pristupiti otvaranjem poklopca u prisutnosti plamena bez opasnosti od kontaminacije. U ovoj vrsti reaktora može se provoditi regulacija temperature, relativne vlažnosti i protoka zraka kroz sloj supstrata (Durand, 2002.).



Slika 6 Reaktor u laboratorijskom mjerilu (Durand, 2002.)

Osim ova dva reaktora, u skupini laboratorijskih reaktora razvijeni su i bioreaktori s rotirajućim bubnjem, bioreaktori s perforiranim bubnjem i horizontalni bioreaktor s lopatastom miješalicom (**Slika 7**).



Slika 7 a) Bioreaktor s rotirajućim bubnjem, b) Bioreaktor s perforiranim bubnjem i c) Bioreaktor s lopatastim mješalima (Durand, 2002.)

Sa ili bez plašta za rashladnu vodu, ovim tipovima reaktora je potrebno kontinuirano miješanje kako bi se povećao kontakt između stijenke bioreaktora i čvrste podloge, pri čemu se osigurava kisik za radne mikroorganizme. Za bioreaktor s rotirajućim bubanjem, kao i horizontalnim cilindrom, miješanje je omogućeno turbulentnim gibanjem čvrstog medija što može biti potpomognuto pregradama u unutrašnjosti zida rotirajućeg bubanja (perforiran ili ne perforiran). Međutim, u svim tim reaktorima, miješanje je manje učinkovito nego u reaktoru s lopatastom miješalicom.

Aglomeracija čestica podloge, tijekom rasta micelija, otežava održavanje konstantne temperature u čvrstom mediju. Prijenos kisika unutar podloge, aglomerirane uslijed prerastanja micelija gljiva, usporen je ili spriječen radi ljepljivosti materijala.

Horizontalni bioreaktor s lopatastim miješalima korišten je za različite svrhe i ima dobru kontrolu temperature i vlažnosti supstrata. Iako je prijenos topline do stijenke bioreaktora poboljšan, ovaj uređaj postaje neučinkovit kada su u pitanju veći volumeni. Kontinuirano miješanje, čak i ako je sporo, može dovesti do narušavanja strukture čvrstog medija. Ovisno o prirodi čvrstog nosača (npr. ako se radi o inertnom nosaču poput čestica gline), ovo miješanje također može biti abrazivno i pokidati micelij (Durand, 2002.).

2. Bioreaktori u poluindustrijskom mjerilu ili poluindustrijski bioreaktori

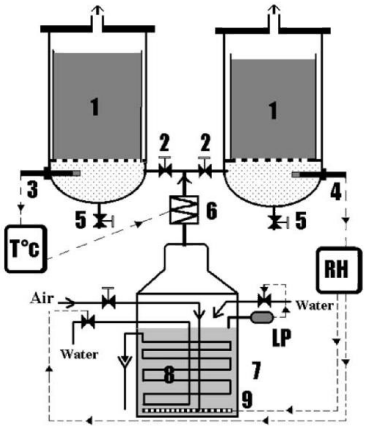
2.1. Bioreaktor bez prisilne aeracije

Ova vrsta bioraektora je starija i koristila se za fermentaciju raznih sirovina zaostalih u poljoprivrednoj proizvodnji i slična je fermentoru s pliticama. Plitice mogu biti izrađene od drveta, metala ili plastike, perforirane ili ne, pri čemu je sloj čvrstog supstrata najviše debljine 15 cm. Plitice su smještene u tremostatiranoj komori te se slažu u slojevima s razmakom od nekoliko centimetara. Ova tehnologija zahtjeva velike površine i intenzivni rad i teško ju je primijeniti u procesima koji zahtijevaju visoku aseptičnost (sterilnost). Kao alternativa mogu se koristiti polupropusne sterilne vrećice od polipropilena, međutim one mogu imati mikroporoznu zonu koja omogućava pasivni protok zraka 0,02 – 2 dm^3/min (Durand, 2002.).

2.2. Bioreaktor s prisilnom aeracijom

Osnovna značajka izvedbe ovog bioreaktora (**Slika 8**) je uvođenje zraka preko sita na koja se postavlja supstrat. Smješten u čistu prostoriju, bioreaktor može biti pasteriziran *in situ*. Vrlo je jednostavan i može se koristiti za obraditi nekoliko kilograma čvrstog materijala. Ovaj bioreaktor predstavlja sustav koji se može koristiti: (i) za analizu procesa i određivanje okolnih parametara za reguliranje temperature i vlažnosti čvrstog materijala, (ii) za proučavanje prijenosa topline i tvari te difuzije kisika.

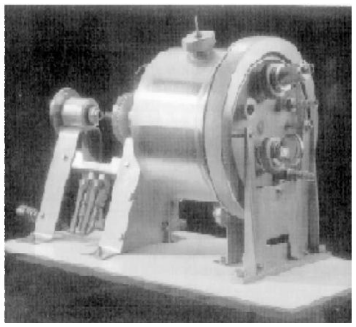
Promjer dna reaktora i visina podloge je oko 40 cm. Nema mehaničkog miješanja unutar reaktora. Kod ovog tipa uređaja bez miješanja temperaturni gradijent je prisutan od dna do vrha sloja supstrata. Većina topline nastala isparavanjem vode isušuje sloj supstrata zbog čega je potrebno dodavati vodu (Durand, 2002.).



Slika 8 Bioreaktor s prisilnom aeracijom

2.3. Bioreaktor s kontinuiranim miješanjem i aeracijom

Kod ovog tipa bioreaktora, kontinuirano miješanje ostvaruje se rotirajućim bubnjem (**Slika 9**). Unutrašnjost bioreaktora karakteriziraju pregrade koje bi trebale olakšavati prijenos topline i kisika, iako su istraživanja učinkovitosti ovakvog dizajna pokazala da je prijenos topline i kisika otežan prilikom miješanja škrobnog ili drugog ljepljivog materijala.



Slika 9 Biorekator s kontinuiranim miješanjem i aeracijom

2.4. Bioreaktor s prisilnom aeracijom i povremenim (izmjeničnim) miješanjem

Kod ovog tipa bioreaktora, uređaj za miješanje se osim za povremeno miješanje supstrata koristi i za raspršivanje vode po materijalu. Kapacitet bioreaktora se kreće od nekoliko kilograma do nekoliko tona, što zna predstavljati problem s aseptičnošću procesa. Projektirani su različiti bioreaktori ovoga tipa u svrhu proizvodnje različitih proizvoda (slada, sojinog umaka). INRA tim iz Francuske razvio je ovaj tip bioreaktora za nesterilne procese u nesterilnim uvjetima prema sljedećem principu. Konstantna temperatura i vlažnost supstrata u bioreaktoru održavaju se regulacijom temperature, relativne vlažnosti i protoka zraka na ulazu. Povremeno je potrebno provesti ovlaživanje medija i miješanje. Ovakav reaktor se koristi za obogaćivanje poljoprivrednog otpada proteinima, proizvodnju enzima ili biopesticida (Durand, 2002., Ali i Zulkali, 2011.).

2.5.PROJEKTIRANJE BIOREAKTORA

2.5.1. Konstrukcijski dijelovi bioreaktora i izbor konstrukcijskog materijala

Konstrukcijski gledano, bioreaktori su uglavnom cilindrične reakcijske posude sa zaobljenim, koničnim dnom te pripadajućim uređajima/opremom za prijenos topline, miješanje i aeraciju, uređajima za mjerenje i regulaciju te ostalim pomoćnim uređajima koji osiguravaju rad biorekatora. Cilindrični oblik fermentora uglavnom je uvjetovan konstrukcijskim razlozima koji se očituju u mogućnosti postizanja višeg tlaka, učinkovitijim miješanjem te olakšanom čišćenju samog bioreaktora. Bioreaktori su opremljeni s odgovarajućim cjevovodima i ventilima za unos i izvođenje/ispuštanje reakcijske smjese, kontrolnim i mjernim osjetilima, sigurnosnim brtvama, inspekcijskim oknima i dr.

Izbor konstrukcijskog materijala ovisi o velikom broju različitih zahtjeva. Često se za konstrukcijske materijale odabiru materijali koji imaju visoki stupanja mehaničke čvrstoće te otpornosti na različite kemikalije. Isto tako, izbor konstrukcijskog materijala determiniraju i toplinska svojstva materijala. Pojedini dijelovi bioreaktora mogu biti izrađeni od različitih konstrukcijskih materijala prema specifičnim zahtjevima. Nehrđajući čelici klase AISI 304 i AISI 316 čest su izbor konstrukcijskog materijala za izradu bioreaktora posebice u većem, poluindustrijskom ili industrijskom mjerilu.

2.5.2. Proračun debljine stjenke biorektora

Bioreaktori trebaju biti izvedeni tako da ne dođe do deformacija ili oštećenja u uvjetima različitih opterećenja. Opterećenja kojima se izlažu bioreaktori mogu se podijeliti na dvije skupine:

a) Osnovna opterećenja:

- projektni tlak uključujući statički tlak kapljevine u bioreaktoru,
- maksimalna masa bioreaktora i sadržaja u radnim uvjetima,
- opterećenja uslijed vjetra i potresa.

b) Dodatna opterećenja:

- lokalna naprezanja uzrokovana nosačima, unutarnjim dijelovima i cjevovodima spojenim na bioreaktor,
- momenti savijanja uzrokovani ekscentričnošću centra djelovanja radnog tlaka u odnosu na bioreaktor,

- naprezanja uslijed razlike temperatura i razlike koeficijenta rastezanja materijala,
- opterećenja uzrokovana promjenama temperature i tlaka (Beer, 1994.).

Debljinu stjenke cilindričnog bioreaktora možemo izračunati pomoću formule **(1)**:

$$s = \frac{p \cdot \left(\frac{d}{2}\right)}{E_Z \cdot S - 0{,}6 \cdot p} + s_{kor} \quad \textbf{(1)}$$

gdje je: s – debljina stjenke bioreaktora [m],

p – tlak u bioreaktora [Pa],

d – promjer bioreaktora [m],

E_z – faktor kvalitete zavarenih spojeva (0,8 – 1),

S – dopušteno naprezanje konstrukcijskog materijala [Pa],

s_{kor} – korozijski dodatak [m] (Šef i Olujić, 1988.).

2.5.3. Volumen bioreaktora

Horizontalni cilindrični reaktor ima volumen prema formuli **(2)**:

$$V_0 = 2 \cdot V_1 + V_2 \quad \textbf{(2)}$$

gdje je: V_0 – ukupni volumen horizontalnog cilindričnog bioreaktora [m^3],

V_1 – volumen elipsoidne glave bioreaktora [m^3],

V_2 – volumen cilindričnog dijela bioreaktora [m^3].

Volumen elipsoidne glave bioreaktora se računa prema formuli **(3)**:

$$V_1 = \frac{2}{3}(\pi a^3)\beta = \frac{1}{3}(\pi a^3) \quad \textbf{(3)}$$

gdje je: V_1 – volumen elipsoidne glave bioreaktora [m^3],

β – kut elipsoidne glave (0,5),

a – polumjer cilindričnog bioreaktora.

Volumen cilindričnog dijela bioreaktora se računa prema formuli **(4)**:

$$V_2 = \pi \cdot a^3 \cdot \lambda$$
$$\lambda = \frac{L}{a}\ ; \quad d = 2a \qquad \textbf{(4)}$$

gdje je: V_2 – volumen cilindričnog dijela bioreaktora [m^3],

λ – relativna duljina cilindrične ljuske bioreaktora [m],

d – promjer bioreaktora (Magnucki i sur., 2004.).

2.5.4. Masa bioreaktora

Masa horizontalnog cilindričnog bioreaktora se računa prema formuli **(5)**:

$$m_S = 2 \cdot m_1 + m_2 \qquad \textbf{(5)}$$

gdje je: m_s – ukupna masa bioreaktora [kg],

m_1 – masa elipsoidne glave bioreaktora [kg],

m_2 –masa cilindričnog dijela bioreaktora [kg].

Masa elipsoidne glave bioreaktora se računa prema formuli **(6)**:

$$m_1 = \pi \cdot \rho_S \cdot a^2 \cdot t_1 \cdot c_m \qquad \textbf{(6)}$$

gdje je: m_1 – masa elipsoidne glave bioreaktora [kg],

ρ_s – gustoća mase stjenke [kg/m^3],

a – faktor za određivanje kapaciteta koničnog dna bioreaktora (0,606)

t_1 – debljina elipsoidne glave bioreaktora [m],

c_m – za elipsoidnu glavu bioreaktora ≈ 1,38017.

Masa cilindrične ljuske bioreaktora se računa prema formuli **(7)**:

$$m_2 = 2\pi \cdot \rho_S \cdot a^2 \cdot t_2 \cdot \lambda \quad \textbf{(7)}$$

gdje je: m_2 – masa cilindričnog dijela bioreaktora [kg],

ρ_s – gustoća mase stjenke [kg/m^3],

a – faktor za određivanje kapaciteta koničnog dna bioreaktora (0,606),

t_2 – debljina cilindričnog dijela bioreaktora [m],

λ – relativna duljina cilindrične ljuske bioreaktora [m], (Magnucki i sur., 2004.).

Za uvećanje mjerila procesa koristi se "*scale-up*" faktor koji se može izračunati preko radnog volumena i površine prijenosa topline, prema izrazu **(8)**:

$$SUF = \frac{W_{V2}}{W_{V1}} = \frac{A_2}{A_1} \quad \textbf{(8)}$$

gdje je: SUF – "*scale-up*" faktor,

W_{V2} – radni volumen većeg bioreaktora[m^3],

W_{V1} – radni volumen pilotnog bioreaktora[m^3],

A_2 – površina prijenosa topline većeg bioreaktora [m^2],

A_1 – površina prijenosa topline manjeg bioreaktora [m^2].

Ako se računa preko radnog volumena, tada se koristi sljedeći izraz **(9)**:

$$W_V = F \cdot [a \cdot D^3 + d \cdot R \cdot D^3] \quad \textbf{(9)}$$

gdje je: W_V – radni volumen [m^3],

F – radni volumen bez volumena koničnog dna bioreaktora,

a – faktor za određivanje kapaciteta koničnog dna bioreaktora (0,606)

D – unutarnji promjer bioreaktora [m],

D – konstanta (5,875),

R – omjer širine i visine bioreaktora.

Unutarnji promjer bioreaktora računa se prema formuli **(10):**

$$D = \left[\frac{\left(\frac{W_V}{F}\right)}{(a + d \cdot R)}\right]^{1/3} \quad \textbf{(10)}$$

Konstanta d se dobije prema formuli **(11)**

$$d = 7{,}48 \cdot \left(\frac{\pi}{4}\right) = 5{,}875 \quad \textbf{(11)}$$

Omjer promjera i visine računa se prema formuli **(12):**

$$R = \frac{L}{D} \quad \textbf{(12)}$$

gdje je: L – visina bioreaktora [m],

D – promjer bioreaktora [m].

Ako se računa preko površine prijenosa topline, tada se koristi sljedeći izraz **(13):**

$$A = f \cdot D^2 + g \cdot R \cdot D^2 \quad \textbf{(13)}$$

gdje je: A – površina izmjene topline [m^2],

f, g – konstante.

Konstanta *f* se računa prema formuli **(14):**

$$f = t + \frac{4 \cdot a \cdot (F - 1)}{7{,}48} \quad \textbf{(14)}$$

gdje je: t – faktor za određivanje koničnog dna (0,931).

Konstanta *g* računa se prema formuli **(15):**

$$g = \pi \cdot F \quad \textbf{(15)}$$

Kod uvećanog procesa umjesto eksponencijalnog koeficijenta *X* koristi se X_2 koju računamo prema formuli **(16):**

$$X_2 = e^{a_1 \cdot b} \quad \textbf{(16)}$$

gdje je: X_2 – eksponencijalni koeficijent,

a_1, b – varijable.

Varijablu a_1 računamo prema izrazu **(17):**

$$a_1 = \frac{k \cdot A}{m' \cdot c_{p\,(vode)}} \quad \textbf{(17)}$$

gdje je: k – koeficijent prolaza topline [W/m^2 K],

A – površina izmjene topline [m^2],

m' – maseni protok rashladnog fluida [kg/s],

c_p – specifični toplinski kapacitet rashladnog fluida [kJ/kg K].

Varijablu b računamo prema izrazu **(18):**

$$b = \frac{SUF_V{}^{\frac{2}{3}}}{k} \tag{18}$$

gdje je: k – konstanta (ovisna o tipu izmjenjivača topline).

Za izračun vremena potrebnog za hlađenje manjeg bioreaktora, vrijednosti dobivene u prethodnim koracima uvrste se u izraz **(19):**

$$t = \left(\frac{M \cdot c_{p(sup.)}}{m' \cdot c_{p(ras.\ medij)}}\right) \cdot \left(\frac{X}{X-1}\right) \cdot ln\left(\frac{T_{1(sup.)} - t_{1(sup.)}}{T_{2(sup.)} - t_{1(ras.\ medij)}}\right) \tag{19}$$

gdje je: M – masa supstrata kojeg je potrebno ohladiti [kg].

Za izračun vremena potrebnog za hlađenje višestruko većeg bioreaktora, vrijednosti dobivene u prethodnim koracima uvrste se u izraz **(20):**

$$t = \left(\frac{SUF_V \cdot M \cdot c_{p(sup.)}}{m' \cdot c_{p(ras.\ medij)}}\right) \cdot \left(\frac{e^{a_1 \cdot b}}{e^{a_1 \cdot b} - 1}\right) \cdot ln\left(\frac{T_{1(sup.)} - t_{1(ras.\ medij)}}{T_{2(sup.)} - t_{1(ras.\ medij)}}\right) \tag{20}$$

gdje je: SUF_V – volumni „scale-up“ faktor (KayodeCoker, 2001.).

2.5.5. Projektiranje izmjenjivača topline

Vrijeme grijanja ili hlađenja sadržaja bioreaktora ovisi o radnom volumenu reaktora, termo-fizikalnim svojstvima supstrata, načinu prijenosa topline,konstrukcijskom materijalu, miješanju i aeraciji i sl. Izračunavanje vremena potrebnog za grijanje ili hlađenja reaktora provodi se uz sljedeće pretpostavke:

1. ukupni koeficijent prijenosa topline je konstantan tokom cijelog vremena grijanja ili hlađenja,
2. maseni protoci fluida su konstantni,
3. toplinski kapacitet kapljevine su konstantni tokom cijelog vremena grijanja ili hlađenja,
4. jednaka temperatura ulaznog fluida za grijanje i hlađenje,
5. miješanjem se osigurava jednolika temperature cijelog sadržaja,
6. gubitci topline su zanemarivi (Beer, 1994.).

Proces grijanja i hlađenja supstrata je nestabilan jer protok topline varira s vremenom.

Za proračun se koristi srednja logaritamske razlika temperature (ΔT_m) koja se računa prema formuli (**21**):

$$\Delta T_m = \frac{\Delta T_{ul} - \Delta T_{iz}}{ln\left(\frac{\Delta T_{ul}}{\Delta T_{iz}}\right)} \quad \textbf{(21)}$$

gdje je: ΔT_m – srednja logaritamska razlika temperature [°C],

ΔT_{ul} – razlika ulaznih temperatura [°C],

ΔT_{iz} – razlika izlaznih temperatura [°C].

Razlika izlaznih fluida se računa prema formuli **(22)**:

$$\Delta T_{iz} = T_2 - t_1 \quad \textbf{(22)}$$

gdje je: T_2 –izlazna temperatura supstrata [°C],

t_1 – ulazna temperature rashladnog fluida [°C].

Temperaturnu razliku uzlaznih fluida se računa prema formuli **(23):**

$$\Delta T_{ul} = T_1 - t_2 \quad \textbf{(23)}$$

gdje je: T_1 – ulazna temperatura supstrata [°C],

t_2 – izlazna temperature rashladnog fluida [°C].

Za proračun površine izmjene topline potrebna nam je količina izmljenjene topline, koja se izračunava prema formuli **(24):**

$$Q = m' \cdot c_p \cdot \Delta T_{fluid} \quad \textbf{(24)}$$

gdje je: Q – količina izmljenjene topline [W],

m' –maseni protok rashladnog fluida [kg/s],

c_p –specifična toplina rashladnog fluida [kJ/kg K],

ΔT_{fluid} – temperaturna razlika rashladnog fluida [°C].

Nadalje, preko dobivenih vrijednosti možemo izračunati i površinu izmjene topline prema formuli **(25):**

$$A = \frac{Q}{k \cdot \Delta T_m} \quad \textbf{(25)}$$

gdje je: A – površina izmjene topline [m^2],

Q – količina izmjenjene topline [W],

k – koeficijent prolaza topline [W/m^2 K],

ΔT_m – srednja logaritamska razlika temperature [°C].

Izračun vremena potrebnog za hlađenje započinjemo s navedenim izrazom **(26):**

$$X = e^{\frac{k \cdot A}{m \cdot c_p}} \quad \textbf{(26)}$$

gdje je: X – eksponencijalni koeficijent,

k – koeficijent prolaza topline [W/m^2 K],

A – površina izmjene topline [m^2],

M – maseni protok rashladnog fluida [kg/s],

c_p – specifična toplina rashladnog fluida [kJ/kg K].

Izlaznu temperaturu rashladnog fluida računamo prema formuli **(27):**

$$t_2 = T + \frac{t_1 - T}{X} \quad \textbf{(27)}$$

gdje je: t_2 –izlazna temperatura rashladnog fluida [°C],

T –temperatura supstrata [°C],

t_1 – ulazna temperatura rashladnog fluida [°C].

2.5.6. Miješanje i proračun snage potrebne za miješanje

Miješanje je pomoćna tehnološka operacija koja se provodi u svrhu uspostavljanja i održavanja što homogenijeg stanja, odnosno sastava, u mehaničkom, kemijskom/biokemijskom te termičkom smislu, u određenoj količini materijala. Miješanjem želimo postići jednaku raspodjelu čestica, homogen sastav te ujednačen prosječni kemijski sastav kao i jednoliku temperaturu na svakom mjestu mase koja je podvrgnuta ovoj operaciji pomoću različitih miješala (Velić, 2011.).

Miješala u obliku turbine su najzastupljenija vrsta miješala a pogodna su za miješanje svih kapljevina i rijetkih suspenzija izuzev vrlo viskoznih sustava. Različitog su oblika, a najčešća su s ravnim i zakrivljenim lopaticama. Treba spomenuti da se snaga miješanja ne mijenja značajno s porastom viskoznosti u turbulentnom području strujanja. Turbinske miješalice, pogotovo s ravnim lopaticama omogućuje radijalno miješanje fluida u posudi (Gomzi, 1998.).

Propelerska miješala su pogodna za miješanje kapljevina niskog viskoziteta. Broj okretaja propelerskih miješala malog promjera obično je 1700 min^{-1}, a kod miješala većeg promjera broj okretaja iznosi od 400 do 800 min^{-1}. Uzrokuju uglavnom aksijalno strujanje kapljevine, pogodna su za miješanje u velikim posudama, jer struja kapljevine djeluje i na većim udaljenostima od propelera. Od svih miješala ova imaju najmanji promjer (max. 400 mm); (Velić, 2011.).

U praksi su česta sidrasta miješala koje se većinom koriste za miješanje viskoznih kapljevina ili za umiješavanje krutina. Također, često se primjenjuju i tzv. lopatasta miješala s ravnim ili zakrivljenim lopaticama te pužna i zavojna koja su specijalno namijenjena za vrlo viskozne sustave (Gomzi, 1998.).

U bioreaktorskoj posudi za miješanje često se ugrađuju pregrade/odbijači koji imaju ulogu sprječavanja nastajanje vrtloga ili rotacije cjelokupne reakcijske smjese. Obično se koriste dvije i četiri pregrade. Za propelerska miješala širina pregrade trebala bi biti manja od 1/18 promjera spremnika. Za turbinska miješala širina bi trebala biti manja od 1/12 promjera spremnika. Svi tipovi miješala uglavnom koriste odbojnike izuzev sidrastih i pužnih (KayodeCoker, 2001.).

Snaga potrebna za miješanje može se izračuna prema formuli **(28)**:

$$N = \zeta_M \cdot n^3 \cdot \rho \cdot d^5 \qquad \textbf{(28)}$$

gdje je: N – snaga potrebna za miješanje [W],

ζ_M – koeficijent otpora miješanja,

n – broj okretaja miješalice [1/s],

ρ – gustoća fluida [kg/m^3],

d –promjer miješalice [m]

Miješala mogu biti na kraju kratke, odnosno duge osovine koja u prvom slučaju u posudu ulazi odozgo, a u drugom kroz poklopac. Primjenjuju se različiti tipovi miješala. Poradi sprječavanja onečišćenja mikroorganizmima iz okoliša, osovina mora biti dobro zabrtvljena. Brtvljenje osovine koja ulazi odozdo je složenije, jer je brtva u izravnom dodiru s mikrobnom kulturom. Zato se u manjim bioreaktorima ponekad upotrebljavaju elektromagnetska miješala, čime se isključuje brtva i mogućnost onečišćenja (Marić, 2009.).

2.5.7. Mjerenje i upravljanje

Kontrola određenog bioprocesa može se provoditi ručno ili automatski. Kod automatskog podsustava imamo mjerni (mjerna osjetila), upravljački, izvršni (ventili i sklopke) i prijenosni sustav. Za mjerenje koristimo različite senzore kao što su: pH elektroda, kisikova elektroda, različite termosonde i sl.

Svrha upravljanja je dobiti maksimalnu koncentraciju biomase ili proizvoda na kraju bioprocesa uz optimalne troškove. Danas se uz tradicionalnu automatsku tehniku upravljanja koristi i moderna teorija koja nudi metode adaptivne, nelinearne, multivarijabilne kontrole koje se baziraju na matematičkim modelima.

Trenutno najzastupljeniji sustav upravljanja je programni sustav kod kojega se ulazna informacijska varijabla dobiva isključivo iz okoline, a nema informacija o stanju ulazne procesne varijable, varijable stanja bioprocesa ili izlazne varijable. Poremećaji/promjene koji djeluju na bioproces kao informacije ne dolaze do upravljačkog podsustava. Izlazna varijabla upravljačkog podsustava nastaje izvođenjem programa koji je upisan u upravljački podsustav, odatle i naziv ovoga načina upravljanja.

Upravljački podsustav uglavnom čine jedinice kao što su PLC (Eng. *Programmable Logic Controller*), osobna ili procesna računala. Ovo je najzastupljeniji način upravljanja u industriji i kombinira se s ostalim načinima upravljanja kako bi se umanjilo negativno djelovanje poremećaja.

Isto tako, često se koristi i upravljanje u povratnoj sprezi čija osnova upravljanja je mjerenje promjena stanja bioprocesa i povratno djelovanje upravljačkog podsustava na ulazne procesne varijable. Ovaj sustav najčešće se koristi u biotehnologiji.

Osnovna značajka suvremenih upravljačkih podsustava je primjena računala za upravljanje bioprocesa. Računala mogu biti kaskadno ili direktno (Eng. *Direct Digital Contol*; DDC) povezana s upravljačkim podsustavom.

Kod kaskadnog sustava bioproces je neposredno upravljan s regulatorom u povratnoj vezi, a posredno s računalom. Računalo je povezano na ulaz regulatora i predaje regulatoru ulaznu informacijsku veličinu. Kaskadni način upravljanja pruža povećanu sigurnost rada u situacijama kada postoje problemi u radu računala.

Kod direktnog sustava nema više klasičnih regulacijskih krugova, a računalo je direktno vezano na bioproces odnosno na mjerni i izvršni podsustav nadzora bioprocesa. Komunikacija između digitalnog računala i analognog procesa omogućena je primjenom analogno-digitalnih pretvornika. Algoritam upravljanja je računalni program razvijen za vođenje određenog bioprocesa. Velika prednost DDC povezivanja je to što se naredbe u računalnom programu jednostavno mijenjaju i usavršavaju (K. H. Bellgardt, 2000., Velić, 2013.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost upotrebe gljive bijelog truljenja *T. versicolor* u svrhu razgradnje lignoceluloznog materijala u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima te na osnovi dobivenih rezultata eksperimenta projektirati bioreaktor u poluindustrijskom mjerilu.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Supstrat i radni mikroorganizam

Kao supstrat su korišteni izluženi i osušeni repini rezanci zaostali nakon proizvodnje šećera nastao preradom šećera u tvornici Sladorana d.d. Županja. Kao radni mikroorganizam korištena je gljiva bijelog truljenja *T. versicolor* TV6 (**Slika10**). Gljiva je uzgajana na krumpirovom agaru (PDA, Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Italy) tijekom sedam dana pri 27 ºC. Kao inokulum u daljnjim pokusima korišteni su micelijski diskovi promjera 6 mm.



Slika 10 Radni mikroorganizam *T.versicolor* TV6 na krumpirovom agru

3.2.2. Kemikalije

U radu su korištene slijedeće kemikalije:

- kloridna kiselina, HCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- natrijev klorid, NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- reagens orcinol (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- octena kiselina, CH_3COOH (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- nitratna kiselina, HNO_3 (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- etanol, C_2H_5OH (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- vodikov peroksid, H_2O_2 (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- sumporna kiselina, H_2SO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

3.3. APARATURA

Mufolna peć

Određivanje udjela pepela provedeno je u mufolnoj peći Nabertherm LE 14/11/B150 (Njemačka).

Spektrofotometar

Udjeli pentozana određeni su spektrofotometrijski na spektrofotometru SHIMADZU, tip UV-1 700 Pharma Spec. (Deutschland GmbH, Duisburg, Njemačka).

Vodena kupelj

U postupku određivanja udjela celuloze korištena je vodena kupelj JULABOL, tipa SW 23 (Njemačka).

Autoklav

Sterilizacija staklenki, supstrata, hranjivih podloga je provođena u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd).

Sušionik

Sušenje uzoraka provedeno je u sušioniku ST-01/02 (Instrumentaria, tvornica medicinskih instrumenata, Zagreb).

Tresilica

U postupku određivanja udjela pentozana korištena je tresilica Julabo, tip SW 23 (Labortechnik GmbH, Seelbach, Njemačka).

Laboratorijski mlin

Usitnjavanje uzorka provedeno je na laboratorijskom mlinu MF10 basic (IKA Labortechnik, Njemačka).

Konica Minolta

Za određivanje boje uzorka korišten je uređaj Konica Minolta, tipa CR 400.

Halogeni analizator vlage

Određivanje udjela suhe tvari u uzorku provedeno je pomoću halogenog analizatora vlage METTLER TOLEDO, tipa HR73.

Uređaj za ekstrakciju

Određivanje udjela ekstraktivnih tvari je provedeno na uređaju SOXTEC SUSTAV 1040 Extraction Unit (Foss Tecator).

3.4. METODE

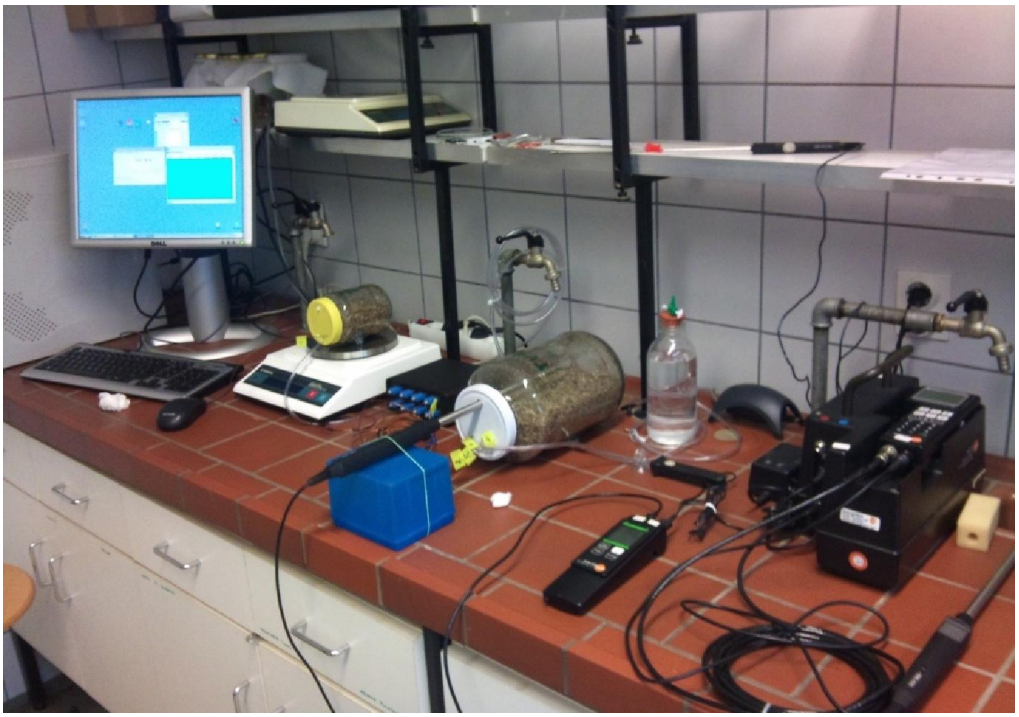
3.4.1. Priprema hranjive podloge za uzgoj radnog mikroorganizma

Izvagano je 42 g krumpirovog agara (Biolife, Italija) i dodano je 1000 mL destilirane vode, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu pri 121 ˚C kroz 15 minuta. Podloga je ohlađena na temperaturu od 45 ˚C do 50 ˚C. Nakon hlađenja podloga je dobro promiješana te prelivena u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice. Na podlogu je potom nacijepljen mikroorganizam. Inkubacija je trajala sedam dana pri 27 °C.

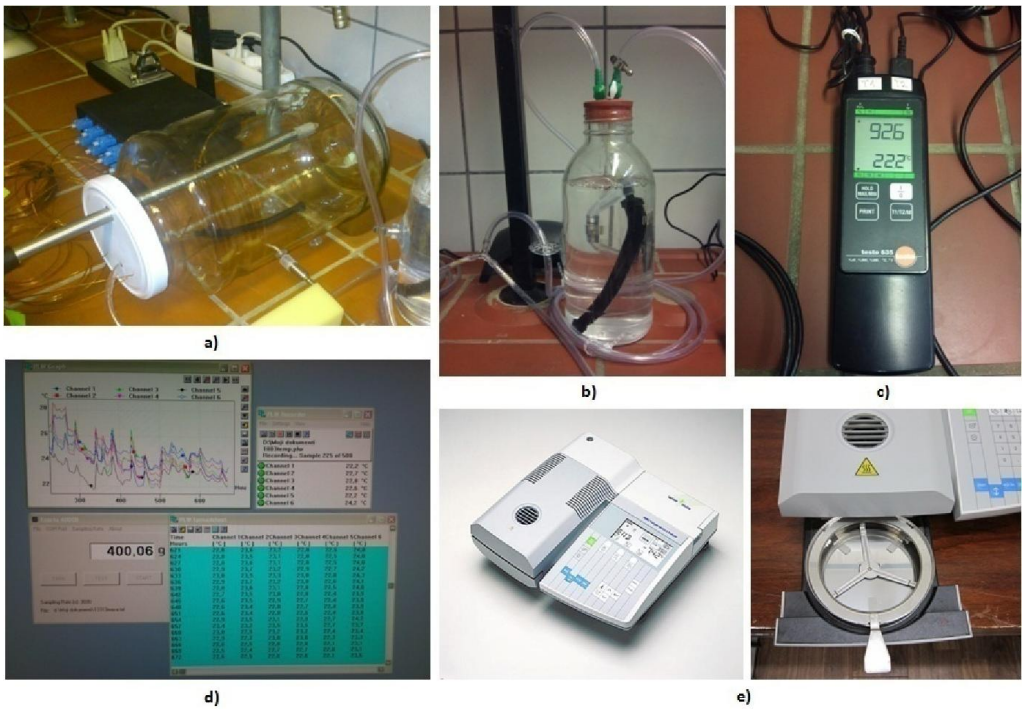
3.4.2. Uzgoj gljive bijelog truljenja *T. Versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Eksperimenti su provedeni u horizontalno-cilindričnom staklenom reaktoru volumena 2000 mL (HBR-1) i horizontalno-cilindričnom staklenom reaktoru volumena 500 ml (HBR-2). Prije provođenja eksperimenta oba dva reaktora su sterilizirana u autoklavu kroz jedan sat. Reaktori su punjeni u omjeru 2.2:1 (kg/kg) repinih rezanaca i vode. Supstrat u HBR-1 je nacijepljen s četrdeset micelijskih diskova kulture *Trametes versicolor*. Tijekom eksperimenta praćene su promjene procesnih parametara (temperatura biomase, stijenke rektora, ambijentalna temperatura, relativna vlažnost) i kemijskog sastava biomase (udio suhe tvari, celuloze, lignina, pentozana, mineralnih tvari) te promjena mase i boja uzorka. Za kontroliranje i mjerenje procesnih parametara korištene su ubodne sonde Tip-K i uređaji Testo 635 i Testo 350. Za određivanje boje uzorka korišten je kromametar Konica Minolta CR400 te za udio suhe tvari halogeni analizator vlage HR73.

Eksperiment je proveden pri ambijentalnoj temperaturi uz aeraciju vlažnim zrakom. Sadržaj horizontalno-cilindričnog staklenog reaktora je ručno miješan svakih 24 sata kroz 5 min. Horizontalno-cilindrični stakleni reaktor i upotrebljena oprema su prikazani na **Slici 11** i **Slici 12**.



Slika 11 Prikaz horizontalno-cilindričnog staklenog reaktora i opreme



Slika 12 a) Horizontalno-cilindrični stakleni reaktor, b) Aeracija sustava, c) Testo 635, d) Prikaz rezultata na računalu, e) Halogeni analizator vlage HR73.

3.4.3. Određivanje udjela vode termogravimetrijskom metodom

U prethodno osušenu (105 °C kroz jedan sat), u eksikatoru ohlađenu, i odvaganu aluminijsku posudicu s poklopcem, izvagano je 2 g (± 0.0001 mg) uzorka. Posuda s uzorkom stavljena je u sušionik, s koso postavljenim poklopcem, koja je prethodno zagrijana na 105 ˚C. Nakon sušenja u trajanju od četiri sata uzorak je stavljen u eksikator na hlađenje.

Nakon hlađenja kroz jedan sat uzorak je izvagan, ponovno stavljen u sušionik kroz jedan sat, ohlađen i izvagan na analitičkoj vagi. Postupak je ponavljan do konstantne mase.

Udio vode izračunat je prema izrazu:

$$w = \frac{b-a}{b} \cdot 100\ [\%] \qquad \textbf{(29)}$$

gdje su:

a – masa uzorka nakon sušenja [g];

b – masa uzorka prije sušenja [g];

w - udio vlage u uzorku [%].

3.4.4. Određivanje udjela pepela

Za određivanje udjela pepela odvagano je 2 g uzorka, te ista količina uzorka za određivanje suhe tvari. Odvagani uzorak raspoređen je rahlo u slojevima u prethodno ožarene i izvagane lončiće za spaljivanje. Uzorak u lončićima za spaljivanje prethodno je karboniziran na električnom grijaču. Nakon karbonizacije, lončići su stavljeni u peć za spaljivanje Nabertherm LE 14/11/B150 (Njemačka) zagrijanu na 570 °C. Po završetku spaljivanja lončići su izvađeni iz peći, ostavljeni jednu minutu na azbestnoj mrežici te stavljeni u eksikator. Nakon hlađenja kroz jedan sat, lončići su izvagani i izračunat je udjel pepela prema izrazima (**30**) i (**31**):

$$pepeo = \frac{m_p}{m_{ASU}} \cdot 100\ [\%] \qquad \textbf{(30)}$$

gdje su:

m_p – masa pepela [g];

m_{ASU} – masa apsolutno suhog uzorka [g].

$$m_{ASU} = \left(m_{P+U} - m_p\right) - \left(\left(m_{P+U} - m_p\right) \cdot \left(\%_{H_2O}/100\right)\right) \text{[g]} \quad \textbf{(31)}$$

gdje su:

m_{P+U} – masa posudice i uzorka [g];

m_p – masa posudice [g];

$\%_{H2O}$ – udio vode [%].

3.4.5. Određivanje udjela pentozana

Udio pentozana određen je prema metodi TAPPI T223 cm-01 (2011.). U okruglu tikvicu stavljeno je 1 g neekstahiranog uzorka repinih rezanaca. Dodano je 20 g NaCl, 100 mL 3,85 N HCl i nekoliko kamenčića za vrenje. Tikvica je spojena na aparaturu za destilaciju, te je označen nivo kiseline u tikvici. U lijevak za odjeljivanje dodano je 250 mL 3,85 N HCl. Kiselina je dodavana ujednačenim protokom od oko 2,5 mL po minuti, a destilat je sakupljen u odmjernoj tikvici od 250 mL (uronjenoj u led). Tijekom destilacije održavan je konstantan volumen od 100 mL. Destilat je skupljan tijekom 90 minuta. Destilat (*T = 20* °C) je nadopunjen s 3,85 N HCl do 250 mL i dobro promiješan. Otpipetirano je 5 mL destilata u odmjernu tikvicu od 50 mL, dodano 25 mL orcinol reagensa, promiješano i termostatirano pri 25 ± 1 °C. Nakon 60 ± 5 minuta nadopunjeno je etanolom do 50 mL, promiješano i ponovno termostatirano 60 ± 5 minuta. Mjerena je apsorbancija pri 630 nm i na osnovu prethodno izrađene baždarne krivulje izračunat udjel pentozana u uzorku.

$$pentozani = \frac{m_{ks}}{(10 \cdot 0{,}3)} \text{[\%]} \quad \textbf{(32)}$$

gdje je:

m_{ks} – masa ksilana (g).

3.4.6. Određivanje udjela celuloze

Udjel celuloze određen je prema Rivers i sur. (1983.). U epruvete je odvagano 0,8 g prethodno usitnjenog ekstrahiranog uzorka. Uzorku je dodano 30 mL reagensa prema Updergraff (1969.) (150 mL 80% CH_3COOH + 15 mL konc. HNO_3) i stavljeno u vodenu kupelj na 100 °C kroz jedan sat. Nakon jednog sata uzorak je filtriran preko filter papira na Büchnerovom lijevku. Nakon filtracije uzorak je ispran dva puta s 95% alkoholom.

Uzorak s filter papirom prebačen je u aluminijskim posudicama u sušionik, gdje je osušen do konstantne mase pri 105 °C . Uzorci s filter papira prebačeni su kvantitativno u porculanske lončiće uz pomoć 95% etanola. Etanol je otparen na vodenoj kupelji, dok uzorak nije postao potpuno suh. Uzorak je zatim kvantitativno prebačen u epruvete, te je dodano 30 mL 72% H_2SO_4. Epruvete s uzorkom stavljene su u vodenu kupelj na 30 °C kroz jedan sat. Kada je sav uzorak otopljen provedena je filtracija preko sinter lončića koji su zatim sušeni u sušioniku do konstantne mase pri 105 °C.

Udjel celuloze izračunat je prema formuli:

$$celuloza = \frac{m_c}{m_{aps}} \cdot 100\ [\%]$$
$$m_c = m_{CPO} - m_{PO}\ [\text{g}] \qquad \textbf{(33)}$$

gdje su:

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

m_C – konačna masa uzorka (g);

m_{CPO} – masa početnog uzorka (g);

m_{PO} – masa uzorka na kraju postupka (g).

3.4.7. Određivanje boje uzorka

Na samom početku potrebno je odrediti vrstu boje (crvena, plava, zelena, žuta), zasićenost boje, tj. „kroma“ koja predstavlja intenzitet boje; te reflektiranu ili apsorbiranu svjetlost. Ako se u jednakoj mjeri reflektiraju sva valna područja bijele, tj. sunčeve svjetlosti, tada nam se predmet čini bijel. Ako se u potpunosti apsorbira sunčeva svjetlost, to rezultira crnom bojom predmeta (AOAC, 1995 i ASTIM D2244, 2002.).

Mjerenje boje uzoraka provedeno je pomoću kromametra Konica Minolta CR 400 (**Slika 13**). Ovakav tip kromametra mjeri reflektiranu svjetlost s površine predmeta. Predmet se postavlja na otvor mjerne glave promjera 8 mm.

U otvoru se nalazi ksenonska lučna svjetiljka, koja pulsiranjem baca svjetlost okomitu na površinu predmeta. Svjetlost se reflektira, a takvu svjetlost mjeri šest jako osjetljivih silikonskih fotoćelija. Podatci se pohranjuju u zapisuje računalo i izražavajuu pet različitih sustava (X, Y, Z; Yxy; Lab; LCH; Hunter Lab).

U radu je korišten *Lab* sustav, koji daje približne vrijednosti kao i ljudsko oko.

*L** - vrijednosti daju ocjenu je li nešto tamno ili svijetlo. Ako je L* = 0, tada je predmet crn, a ako je L* = 100, tada je bijel.

*a** - vrijednost može biti pozitivna ili negativna. Ako je pozitivna, tada je rezultat crvena boja; a ako je negativna, rezultat je zelena boja.

*b** - vrijednost može, također biti pozitivna ili negativna. Ako je pozitivna, rezultat je žuta boja; a ako je negativna, rezultat je plava boja.

U ovom eksperimentalnom radu su praćene *a**, *b** i *L** vrijednosti suhih i vlažnih uzoraka te uzoraka koji su izuzimani iz bioreaktora tijekom procesa fermentacije .

Ukupna promjena boje (ΔE) je izračunata po formuli **(34)**:

$$\Delta E = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]} \quad \textbf{(34)}$$

te kao promjena boje (C^*_{ab}) **(35)**:

$$C^*_{ab} = \sqrt{[(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]} \quad \textbf{(35)}$$



Slika 13 Kromametar Konica Minolta CR 400

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. RAZGRADNJA REPINIH REZANACA POMOĆU GLJIVE BIJELOG TRULJENJA *T. versicolor* U HORIZONTALNO-CILINDRIČNOM STAKLENOM REAKTORU I PRI UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Gljiva bijelog truljenja, *Trametes versicolor* TV6, uzgajana je na lignoceluloznom materijalu, repinim rezancima zaostalim nakon proizvodnje šećera. Kemijski sastav repinih rezanaca određen je prije i nakon fermentacije s gljivom bijelog truljenja *T. versicolor*. Gubitak na masi lignoceluloznog materijala, udjeli pepela i pentozana određeni su u neekstrahiranim uzorcima. U krutom ostatku zaostalom nakon ekstrakcije ekstraktivnih tvari (ekstrahirani uzorak) određeni su udjeli celuloze. Eksperiment je proveden u horizontalno-cilindrično staklenom reaktoru (**Slika 14**) te su analizirani utjecaji načina miješanja i aeracije vlažnim zrakom na rast biomase.

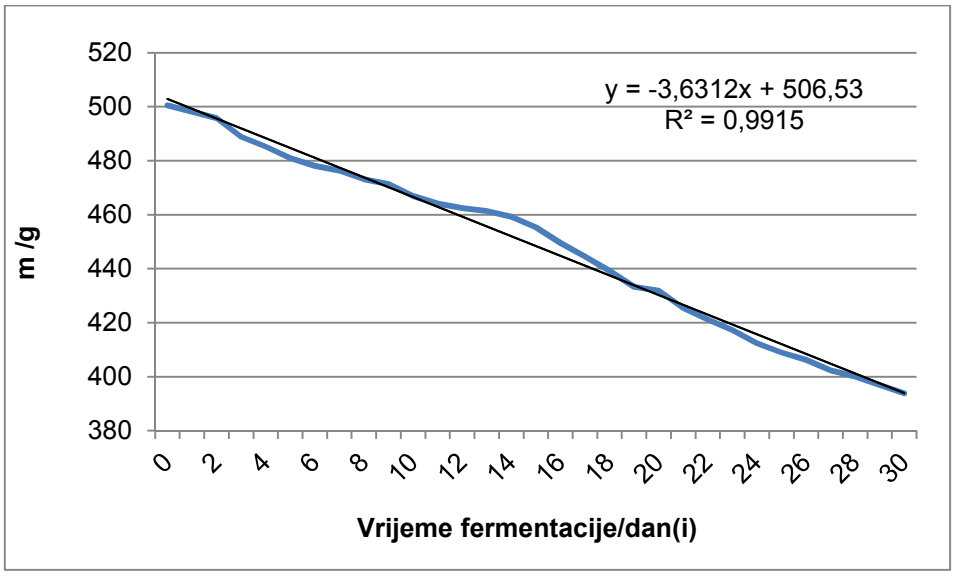


SLIKA 14 Repini rezanci nacijepljeni s *T. versicolor* u horizontalno-cilindričnom staklenom reaktoru

4.1.1. Praćenje procesnih parametara tijekom eksperimenta u HBR

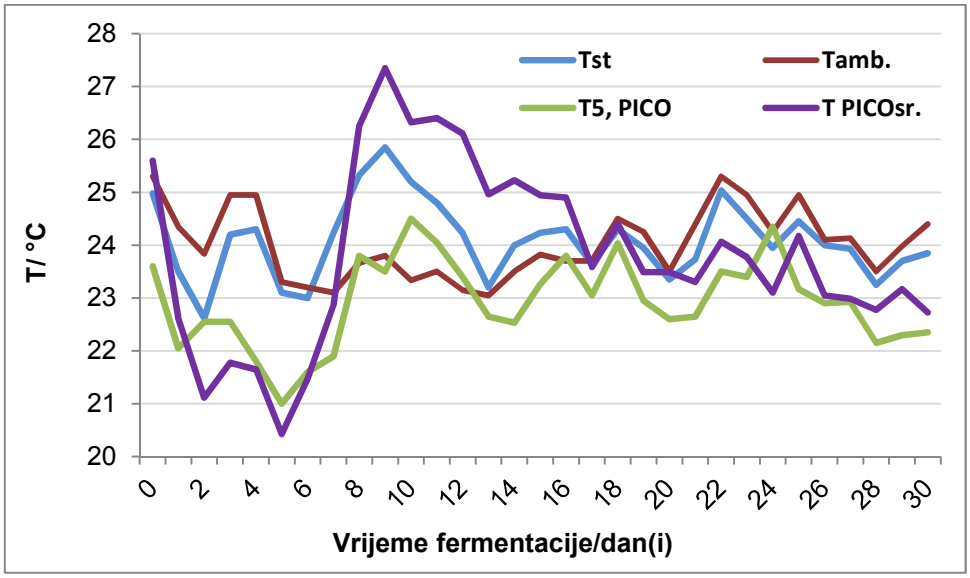
Tablica 3 Mjerenja procesnih parametara tijekom eksperimenta

t [dani]	RH [%]	$T_{1,}$ (t_{zr}) [°C]	$T_{PICOavg}$ [°C]	$T_{amb.}$ [°C]	T_{st} [°C]	T_5 [°C]	m_{uz}[g]	T_6 [°C]
0	**92,8**	**25,2**	**25,60**	**25,3**	**24,98**	**23,6**	**500,55**	**26,3**
1	93,7	22,15	22,63	24,35	23,5	22,05	498,19	24,2
2	96,0	20,17	21,12	23,83	22,62	22,55	495,80	23,9
3	94,2	21,20	21,78	24,95	24,20	22,55	488,85	25,2
4	94,3	21,00	21,65	24,95	24,30	21,80	485,24	25,5
5	94,9	21,30	20,43	23,30	23,10	21,00	480,95	24
6	95,2	21,20	21,48	23,20	23,00	21,60	478,11	23,7
7	95,6	19,78	22,88	23,10	24,23	21,90	476,34	23,5
8	95,0	22,43	26,25	23,67	25,33	23,80	473,15	24,8
9	93,2	18,50	27,35	23,80	25,85	23,50	471,34	25,1
10	95,3	18,30	26,33	23,33	25,20	24,50	466,94	25,3
11	94,1	21,60	26,40	23,50	24,80	24,05	464,07	25,75
12	94,6	19,23	26,11	23,15	24,23	23,40	462,50	25,57
13	94,2	19,25	24,96	23,05	23,20	22,65	461,38	24,6
14	93,6	21,80	25,23	23,50	24,00	22,53	459,30	24,8
15	95,2	18,13	24,94	23,83	24,23	23,27	455,38	25,03
16	95,6	19,1	24,9	23,7	24,3	23,8	449,53	26,30
17	96,3	18,35	23,59	23,7	23,65	23,05	444,61	25,10
18	95,8	19,17	24,40	24,5	24,3	24,03	439,17	25,30
19	94,8	19,57	23,49	24,25	23,95	22,95	433,34	24,60
20	94,5	19,97	23,49	23,5	23,35	22,60	431,84	23,95
21	95,7	20,00	23,30	24,4	23,73	22,65	425,45	24,53
22	95,8	19,83	24,06	25,3	25,03	23,50	421,20	25,40
23	95,9	19,55	23,78	24,95	24,50	23,40	417,29	25,15
24	96,7	17,20	23,10	24,25	23,95	24,35	412,45	24,35
25	96,5	17,67	24,18	24,95	24,45	23,17	408,99	24,70
26	95,9	18,05	23,05	24,1	24,00	22,90	406,20	24,00
27	95,3	18,98	22,99	24,13	23,93	22,93	402,35	24,47
28	98,7	14,92	22,78	23,50	23,25	22,15	400,10	23,45
29	98,5	14,30	23,17	23,98	23,70	22,30	396,87	24,07
30	97,1	16,94	22,73	24,40	23,85	22,35	393,77	23,95



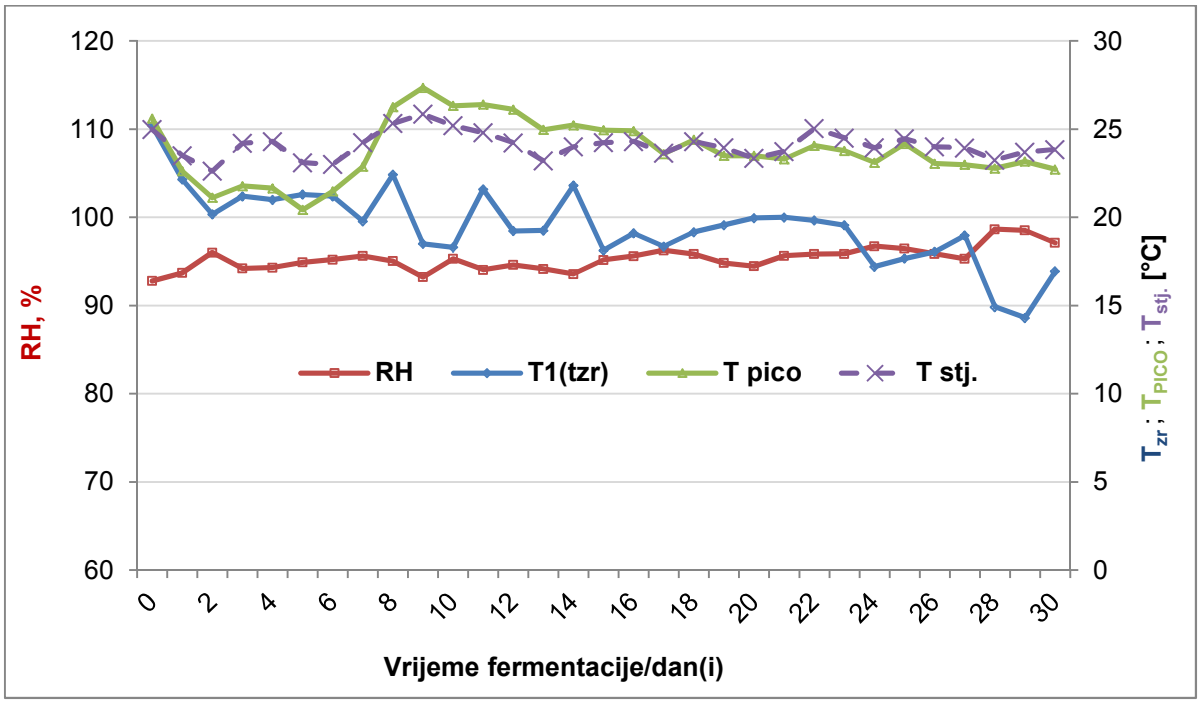
Slika 15 Promjena mase uzorka tijekom fermentacije

Slika 15 prikazuje kontinuiranu promjenu mase uzorka tijekom fermentacije od 30 dana. Na početku eksperimenta, u omjeru 2.2:1 (kg/kg), u horizontalno-cilindrični stakleni reaktor (HBR-1) je dodano 250 g repinih rezanaca i 550 mL vode. U manji horizontalnu-cilindrični stakleni reaktor (HBR-2), u kojem je praćen gubitak mase, dodano je 50 g repinih rezanaca i 110 mL vode. Masa je tijekom eksperimenta sa početnih 500,55 g smanjena na 393,77 g. Postignut je gubitak na masi lignoceluloznog supstarta od 21,33 %.



Slika 16 Promjena temperature tijekom fermentacije (T_{st} – temperatura stjenke HBR-1, T_{amb} – ambijentalna temperatura, $T_{5,PICO}$ – temperatura stjenke HBR-2, $T_{PICOsr.}$ – srednja vrijednost temperature unutar biomase)

Temperature su praćene pomoću ubodnih sondi Tip-K, koje su bile povezane s računalom. **Slika 16** prikazuje promjenu temperatura (T_{st}, T_{amb}, $T_{5,PICO}$ i T_{PICOsr}) tijekom eksperimenta. Ambijentalna temperatura je u intervalu od 23 ºC do 25,3 ºC. Temperature stjenke HBR-1 i HBR-2 imaju razliku temperature od 1 do 2 ºC. Temperatura unutar biomase se kretala u intervalu od 20,5 ºC do 27,5 ºC. Najveća temperatura u biomasi postignuta nakon 9 dana, nakon čega je počela postepeno opadati. Relativna vlažnost u HBR-u nije bila manja od 92 % i održavana je od 92,8 % do 98,7 % (**Slika 17**).



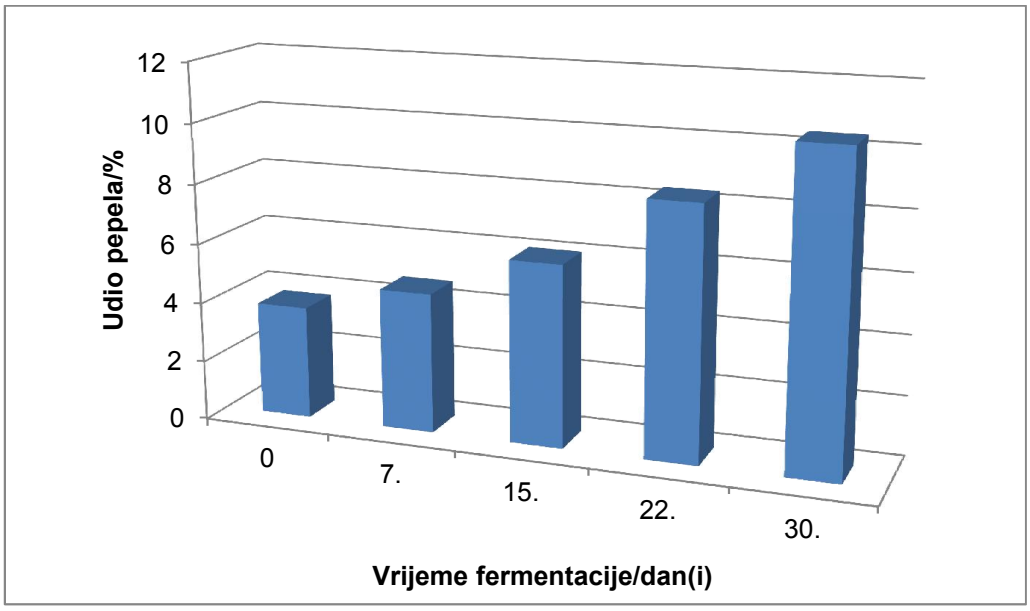
Slika 17 Promjena relativne vlažnosti u HBR-u tijekom fermentacije

4.1.2. Određivanje udjela pepela, celuloze i pentozana u lignocelulozno materijalu (suspstratu) tijekom eksperimenta

Pepeo je anorganski ostatak koji zaostaje nakon uklanjanja organske tvari i vode i predstavlja ukupni udjel mineralnih tvari u uzorku. U uzorcima koji su izuzimani tijekom fermentacije u ovom istraživanju primijećen je kontinuirani porast udjela pepela s produljenjem vremena fermentacije. Nakon 30 dana fermentacije porast u odnosu na početni uzorak iznosio je 175,5 %.

Tijekom istraživanja došlo je do smanjenja udjela pentozana u uzorcima fermentiranih repinih rezanaca, u odnosu na početni uzorak. Postignuta konverzija pentozana nakon 30 dana fermentacije ukazuje na sposobnost *T. versicolor* da razgradi hemicelulozu. *T. versicolor* pentozane koristi kao izvor ugljika za rast i razmnožavanje.

Također *T. versicolor* pokazuje celulitičku aktivnost jer je tijekom istraživanja došlo do smanjenja udjela celuloze. Došlo je do razgradnje celuloze na glukozu koja je korištena za rast i razmnožavanje radnog mikroorganizma.



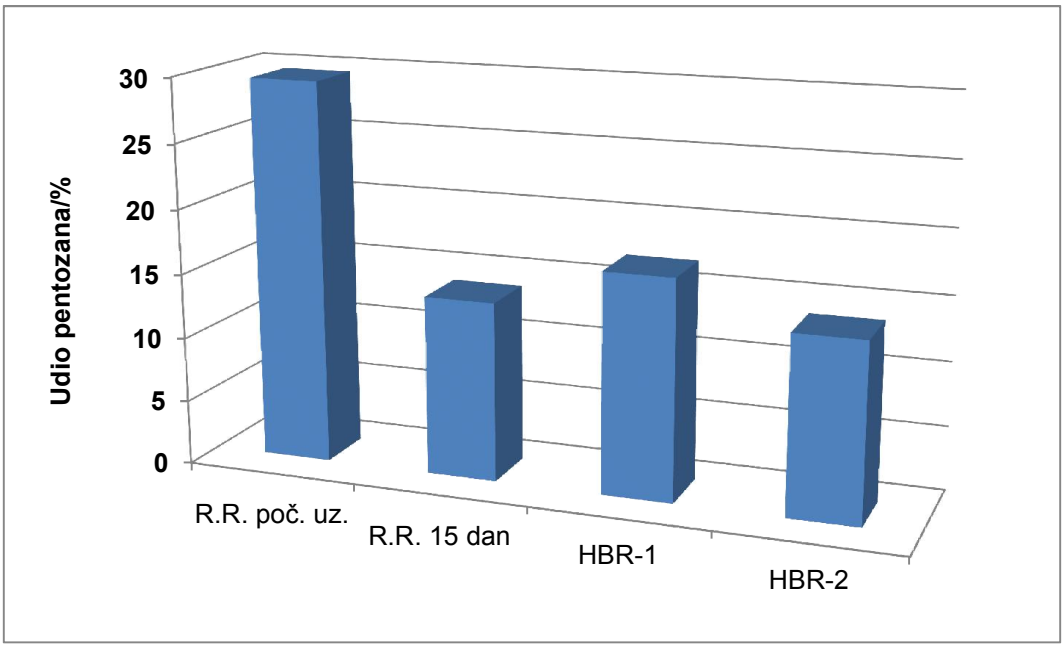
Slika 18 Promjena udjela pepela u uzorku tijekom fermentacije

Slika 18 prikazuje porast udjela pepela/mineralnih tvari u uzorku tijekom fermentacije. Udio pepela se povećao sa početnih 3,79 % na 10,44 % u završnom uzorku.

Izgled supstrata i rast gljive bijelog truljenja je prikazan na **Slici 19**.



Slika 19 Prikaz supstrata tijekom fermentacije i rast gljive bijelog truljenja



Slika 20 Promjena masenog udjela pentozana tijekom fermentacije