

Utjecaj biološke obrade kukuruzovine s *Trametes versicolor* na sadržaj ukupnih i pojedinačnih sirovih vlakana

Sluganović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:109:972467>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

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**

Ana Sluganović

**UTJECAJ BIOLOŠKE OBRADJE KUKURUZOVINE S *TRAMETES
VERSICOLOR* NA SADRŽAJ UKUPNIH I POJEDINAČNIH SIROVIH
VLAKANA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2016

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Kemijski i biokemijski reaktori
Tema rada Je prihvaćena na VII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28.04.2015.
Mentor: doc. dr. sc. Marina Tišma

**UTJECAJ BIOLOŠKE OBRADE KUKURUZOVINE S *TRAMETES VERSICOLOR* NA SADRŽAJ UKUPNIH I
POJEDINAČNIH SIROVIH VLAKANA**

Ana Sluganović, 248-DI

Sažetak:

Poljoprivredni otpad, kao što je primjerice kukuruzovina, je po svom kemijskom sastavu lignocelulozni materijal koji se u najvećoj mjeri sastoji od lignina, celuloze i hemiceluloze. Da bi se mogao upotrebljavati u proizvodnji biogoriva (bioetanola i bioplina) potrebno ga je prethodno obraditi s ciljem razgradnje složenih polimera do jednostavnijih spojeva. Jedna od ekološki prihvatljivih metoda obrade je biološka metoda.

U ovom radu kukuruzovina je biološki obrađena u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima s gljivom bijelog truljenja *Trametes versicolor* s ciljem razgradnje lignina. Analiziran je sastav kukuruzovine (udio vlage, pepela, proteina, slobodnih masti, hlapivih tvari, neutralnih i kiselih detergent vlakana, lignina, celuloze, hemiceluloze i pH) prije, tijekom i nakon obrade. Nakon 30 dana obrade, postignuta je 43,37 % - tna konverzija lignina.

Ključne riječi: *Trametes versicolor*, kukuruzovina, fermentacija na čvrstim nosačima

Rad sadrži: 53 stranica
13 slika
12 tablica
54 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	izv. prof. dr. sc. Mirela Planinić	predsjednik
2.	doc. dr. sc. Marina Tišma	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. Ana Bucić Kojić	član

Datum obrane: 5. srpnja 2016

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 thermodynamic 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. VII. held on July 5th, 2016.

Mentor: Marina Tišma, PhD, assistant prof.

INFLUENCE OF BIOLOGICAL PRETREATMENT OF CORN STOVER BY *TRAMETES VERSICOLOR* ON TOTAL AND INDIVIDUAL CRUDE FIBER

Ana Sluganović, 248-DI

Summary:

Agro-waste, such as corn stover, is lignocellulose-type of material, mainly comprised of lignin, cellulose and hemicellulose. Prior the use in biofuel production (bioethanol and biogas) agro-waste should be pretreated with the aim of polymer degradation till its simple compounds. One of the ecologically friendly method is biological treatment.

In this work, corn stover was biologically treated with white-rot fungus *Trametes versicolor* in solid-state cultivation with the aim of lignin degradation. Chemical composition of corn stover was analyzed (moisture, ash, protein, free fat, volatile substances, neutral and acid detergent fiber, lignin, cellulose, hemicellulose and pH) before, during and after the treatment. After 30 days of treatment, 43,37 % of lignin conversion was gained.

Key words: *Trametes versicolor*, corn stover, solid-state fermentation

Thesis contains: 53 pages
13 figures
12 tables
54 references

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: July 5, 2016.

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

Ovaj rad izrađen je u sklopu "ProBioTech" projekta koji je sufinancirala Europska unija iz Europskog Fonda za regionalni razvoj (EFRR)



Zahvaljujem se mojoj mentorici doc. dr. sc. Marini Tišmi na posvećenom vremenu i brojnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada te gospođi Jelki Babić na pomoći i strpljenju tijekom rada u laboratoriju.

Posebna zahvala mojoj baki koja je sve ovo omogućila i na bezuvjetnoj podršci koju mi je pružala tijekom cijelog studija i veliko hvala mojim roditeljima i bratu na podršci, razumijevanju i strpljenju.

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO	4
2.1.	KEMIJSKI SASTAV LIGNOCELULOZNOG MATERIJALA.....	5
2.1.1.	<i>Kukuruzovina kao lignocelulozni materijal</i>	<i>7</i>
2.2.	METODE PREDOBRADE LIGNOCELULOZNOG MATERIJALA.....	10
2.2.1.	<i>Fizikalne metode predobrade</i>	<i>11</i>
2.2.2.	<i>Kemijske metode predobrade</i>	<i>11</i>
2.2.3.	<i>Biološka metoda predobrade.....</i>	<i>12</i>
2.3.	GLJIVE BIJELOG TRULJENJA	13
2.3.1.	<i>Primjena gljiva bijelog truljenja</i>	<i>15</i>
2.3.2.	<i>Trametes versicolor.....</i>	<i>16</i>
2.4.	FERMENTACIJA NA ČVRSTIM NOSAČIMA	17
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1.	ZADATAK	20
3.2.	MATERIJALI	20
3.2.1.	<i>Supstrat i mikroorganizam.....</i>	<i>20</i>
3.2.2.	<i>Kemikalije.....</i>	<i>20</i>
3.3.	METODE	21
3.3.1.	<i>Priprema kukuruzovine za određivanje kemijskog sastava.....</i>	<i>21</i>
3.3.2.	<i>Određivanje kemijskog sastava kukuruzovine</i>	<i>21</i>
3.3.2.1	Udio vlage	21
3.3.2.2	Udio proteina	22
3.3.2.3	Udio pepela	22
3.3.2.4	Udio masti	23
3.3.2.5	pH vrijednost.....	23
3.3.2.6	Udio vlakana.....	24
3.3.3.	<i>Provedba uzgoja Trametes versicolor u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima</i>	<i>24</i>
3.3.4.	<i>Analitičke metode određivanja kemijskog sastava kukuruzovine tijekom i nakon obrade.....</i>	<i>25</i>
3.3.4.1	Određivanje sirovih vlakana prema Weende-u	25
3.3.4.2	Određivanje sirovih vlakana prema Wijkstrom-u	26
3.3.4.3	Određivanje lignina i celuloze kalijevim permanganatom	26
3.3.4.4	Određivanje neutralnih detergent vlakana prema Van Soest-u	26
3.3.4.5	Određivanje kiselih detergent vlakana prema Van Soest-u	27
3.3.4.6	Određivanje kiselog detergenta lignina prema Van Soest-u.....	27

4.	REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1.	RAZGRADNJA KUKURUZOVINE POMOĆU GLJIVA BIJELOG TRULIENJA	30
4.1.1.	<i>Određivanje kemijskog sastava kukuruzovine prije obrade.....</i>	<i>30</i>
4.1.2.	<i>Provedba procesa predobrade kukuruzovine.....</i>	<i>31</i>
4.1.3.	<i>Udio sirovih vlakana prema Weende-u</i>	<i>32</i>
4.1.4.	<i>Udio sirovih vlakana prema Wijkstrom-u.....</i>	<i>34</i>
4.1.5.	<i>Udio celuloze određivane kalijevim permanganatom.....</i>	<i>35</i>
4.1.6.	<i>Udio neutralnih detergent vlakana prema Van Soest-u.....</i>	<i>36</i>
4.1.7.	<i>Udio kiselih detergent vlakana prema Van Soest-u</i>	<i>40</i>
4.1.8.	<i>Udio kiselog detergenta lignina prema Van Soest-u.....</i>	<i>42</i>
4.1.9.	<i>Udio mineralnih tvari u suhoj tvari uzroka.....</i>	<i>44</i>
5.	ZAKLJUČCI	45
6.	LITERATURA	48

Popis oznaka, kratica i simbola

PTF	Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
CTAB	Cetiltrimetilamonij bromid
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
NDS	Neutralni detergent topljive tvari
ADF	Kisela detergent vlakana
NDF	Neutralna detergent vlakana
ADL	Kiseli detergent lignin
T	Temperatura (°C)
t	Vrijeme (dani)
s.tv.	Suha tvar
LiP	Lignin peroksidaza
MnP	Mangan peroksidaza
SSF	Fermentacija na čvrstim nosačima
SmF	Submerzna fermentacija

1. UVOD

Kontinuirani porast otpada zahtjeva održivo upravljanje otpadom, koje podrazumijeva sprječavanje njegovog nastanka i tretiranje postojećeg. Održivo upravljanje otpadom postao je jedan od glavnih političkih prioriteta Europske unije i važan dio zajedničkih napora u smanjenju zagađenja okoliša. Doprinos zaštiti okoliša očituje se u povećanju energetske učinkovitosti primjenom tehnologija za proizvodnju energije i energenata na način prihvatljiv za okoliš, što je najviše izraženo u području proizvodnje električne energije iz obnovljivih izvora.

Kako bi se smanjila potrošnja fosilnih goriva i na taj način umanjili ekonomski i ekološki problemi, javlja se potreba za novim, energetski i materijalno, učinkovitim procesom proizvodnje energije. Lignocelulozni materijal uglavnom kao ostatak na poljima i šumama je široko rasprostranjen te samim tim predstavlja atraktivnu sirovinu za proizvodnju energije (Wan i sur., 2012).

Lignocelulozni materijal sastoji se od celuloze, hemiceluloze i lignina. Međutim, zbog svoje složene kemijske strukture, polimer lignin, sprječava dostupnost hidrolitičkim enzimima. Prema tome, glavna tehnološka prepreka za korištenje lignoceluloze kao izvora energije predstavlja polimer lignin, te se nameće neophodnost predobrade lignoceluloznog materijala (Abramson i sur., 2009).

Većina tehnologija predobrade zahtijevaju skupe instrumente ili uređaje koji imaju visoke energetske potrebe. Osobito fizikalni i termički procesi zahtijevaju obilje energije za konverziju biomase. Biološka obrada pomoću različitih vrsta filamentoznih gljiva je sigurna i ekološki prihvatljiva metoda, koja se provodi pri blagim reakcijskim uvjetima, koji sprečavaju nastajanje inhibitora. Ovaj proces predobrade ne zahtijeva visoke energetske potrebe za uklanjanje lignina, unatoč tome što se može postići visoki stupanj delignifikacije (Kumar i sur., 2009).

Upravo je cilj ovog diplomskog rada bio istražiti mogućnost upotrebe gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* u svrhu razgradnje kukuruzovine u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Ostatak stabljika, listova i klipa (zrna) na oranicama koja zaostaje nakon žetve kukuruza pri čemu je izdvojeno zrno kukuruza, naziva se kukuruzovina, a može se upotrebljavati kao sirovina za proizvodnju bioetanola, biometana i biokemikalija.

Gljiva *Trametes versicolor* je najrašireniji razgrađivač drvnog materijala koja luči ekstracelularnu kombinaciju lignolitičkih enzima, kao što su lakaza, lignin peroksidaza i

mangan peroksidaza, od kojih je najvažniji enzim lakaza. Lignolitički enzimi sudjeluju u razgradnji složenog i otpornog prirodnog polimera lignina. Njihovo djelovanje se očituje u uklanjanju lignina koji omeđuje celulozu u lignoceluloznom materijalu i razbijanju aromatske strukture lignina kidajući veze između osnovnih jedinica manje molekulske mase. Važnost biološke obrade ovog materijala je zbog njihove daljnje mogućnosti upotrebe u procesima proizvodnje biogoriva ili za primjenu kao stočna hrana.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KEMIJSKI SASTAV LIGNOCELULOZNOG MATERIJALA

Pod pojmom lignocelulozni materijal podrazumijeva se sav poljoprivredni otpad, drvni otpad, otpad iz prehrambene industrije, vodene biljke, trave i ostale biljne tvari. Ovi materijali su jedinstveni po svom kemijskom sastavu, kao i po svojim kemijskim, fizikalnim i mehaničkim svojstvima. Lignocelulozne sirovine čine čvrstu i kompaktnu strukturu kao što je prikazano na **Slici 1** te predstavljaju tehnološki izazov po pitanju razgradnje do jednostavnih spojeva. Lignocelulozni materijal sastoji se od celuloze (40 - 50 %), hemiceluloze (25 - 35 %) i lignina (15 - 20 %) (Kumar i sur., 2009).

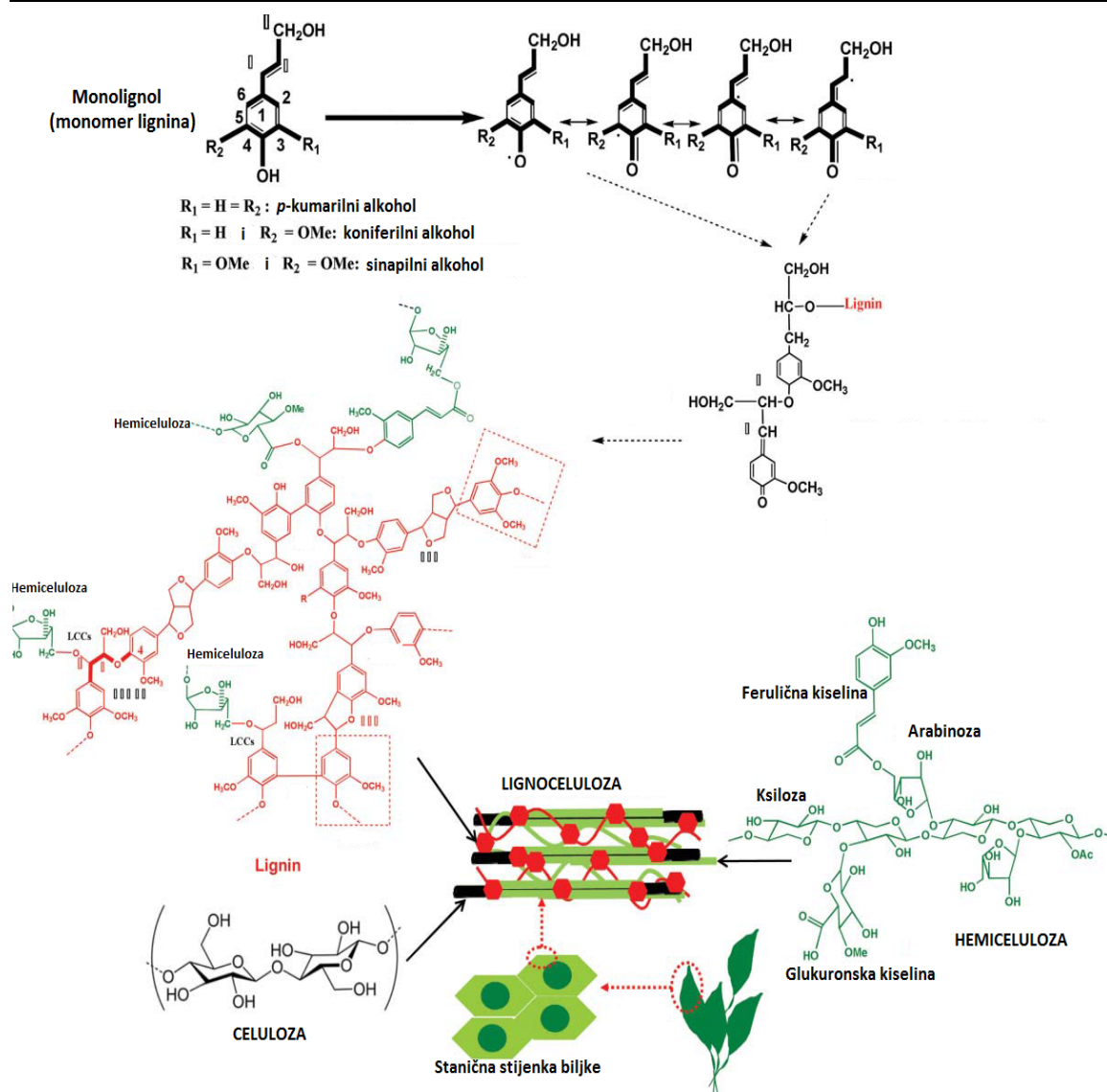
Celuloza je stereoregularni polimer kod kojega su glukozne jedinice povezane β - (1, 4) glikozidnom vezom (**Slika 1**). Celuloza se pojavljuje u obliku mikrovlakana. Sekundarna stanična stijenka sadrži oko 40 % celuloze po suhoj tvari. Visoka čvrstoća mikrovlakana osigurana je povezivanjem lanaca celuloze vodikovim vezama i van der Waalsovima silama. Formiranje vodikovih veza može biti u istom lancu ili sa susjednim lancima, posljedica kojih je formiranje kristalne (pravilne) ili amorfne (nepravilne) strukture celuloze (Shen i sur., 2013). Naime, stupanj kristalizacije celuloze je u korelaciji s udjelom kristalične strukture u staničnoj stijenci lignoceluloznog materijala. Povećanjem stupnja kristalizacije celuloze dolazi do povećanja udjela kristalne strukture celuloze u staničnoj stijenci. Lignocelulozni materijal koji sadrži veći udio celuloze kristalne strukture teže se razgrađuje od lignoceluloze koja sadrži veći udio celuloze amorfne strukture.

Hemiceluloza pripada grupi heterogenih polisaharida koji se stvaraju različitim biosintetskim putevima u odnosu na celulozu. Hemiceluloza je heterogeni polimer pentoza (ksiloza, arabinoza), heksoza (manoz, glukoza, galaktoza) i aciliranih šećera, kao što je vidljivo na **Slici 1**. Udio hemiceluloze ovisi o vrsti tkiva, stupnju razvoja, biljnim vrstama, sastavu bočnih lanaca, stupnju polimerizacije i vrstama glikozidnih veza. U lignoceluloznom materijalu glavni lanac hemiceluloze može biti homopolimer, npr. ksilan, ili heteropolimer, npr. glukomanan. Ksilan se sastoji od povezanih jedinica 1,4- β -D-ksilopiranoze, a osim ksiloze može sadržavati arabinozu, glukuronsku, octenu i feruličnu kiselinu.

Lignin je poslije celuloze najzastupljeniji polimer u prirodi. Sintetiziraju ga gotovo sve kopnene biljke i neke alge. Ugradnja lignina u staničnu stijenku te njegova sinteza tijekom razvoja, važni su procesi za biljku čime je omogućena njezina mehanička čvrstoća te zaštita

od patogena i truljenja uzrokovanih djelovanjem mikroorganizmima. Zbog svoje složene kemijske strukture **Slika 1.**, polimer lignin, povećava otpornost biomase na enzimsku razgradnju, tako što tvori zaštitni sloj oko lanaca celuloze i hemiceluloze (Kujik i sur., 2014). Na **Slici 1.** prikazana je sinteza lignina procesom polimerizacije tri monomera alkohola ili monolignola: *p*-kumarilnog, koniferilnog i sinapilnog koji se međusobno razlikuju u stupnju metoksilacije. Sinapilni alkohol ima dvije metoksi skupine (O-CH_3), koniferilni alkohol jednu, a *p*-kumarilni alkohol ne sadrži metoksi skupinu (Santiago i sur., 2013). Navedeni monolignoli proizvode rezidue u polimeru koji variraju ovisno o vrsti tkiva i biljnoj vrsti, a to su *p*-hidroksifenil, guaiacil i siringil. Primjerice, u četinjačama, gvajacilni lignin nastaje iz koniferilnog alkohola, a u listačama, gvajacil - siringilni lignini sintetiziraju se iz koniferilnog i sinapilnog alkohola.

Većina literature o ulozi polisaharida stanične stijenke u zaštiti biljaka od patogena i raznih nametnika temelji se na analiziranju sastava vlakana. U vlakna se ubrajaju celuloza, hemiceluloza i lignin. Najčešće su analizirana neutralna detergent vlakana (NDF), koja su najviše zastupljena u staničnoj stijenci, a obuhvaćaju sva tri polimera, celulozu, hemicelulozu i lignin. S druge strane, kisela detergent vlakana (ADF) odnose se isključivo na vlakna koja nisu topljiva, a to su celuloza i lignin (Santiago i sur., 2013).



Slika 1. Pojednostavljeni prikaz kemijskog sastava lignoceluloznog materijala (Monlau i sur., 2013).

2.1.1. Kukuruzovina kao lignocelulozni materijal

Kukuruzna silaža je glavno voluminozno krmivo obroka muznih krava i junadi te je odlikuje udio suhe tvari, laka i fleksibilna proizvodnja. Kukuruzna silaža ima svojstva voluminoznog krmiva zbog vlakana, a koncentratnog krmiva zbog škroba. Radi sigurne i kontinuirane hranidbe potrebno je izvesti dobru pripremu kukuruzne silaže (Grbeša, 2008).

Goffart je 1877. prvi opisao proces siliranja kukuruza. U to vrijeme se smatralo da je glavni proizvod pri procesu siliranja alkohol, dok se danas zna da se konzerviranje postiže konverzijom šećera u organske kiseline, posebno u mliječnu i octenu, dok alkohol može također biti prisutan u silaži. Siliranje je način konzerviranja biljaka i njihovih nusproizvoda vlažnim putem, a postiže se fermentacijom u siliranoj masi pomoću različitih mikroorganizama u anaerobnim uvjetima. Najvažniji proizvod u samom procesu siliranja je mliječna kiselina, koja nastaje djelovanjem mliječno-kiselih bakterija u siliranoj masi, a rezultati fermentacije su prikazani u **Tablici 1**.

Tablica 1. Udio reducirajućih šećera mliječne kiseline u kukuruznoj silaži i pH u ovisnosti o suhoj tvari silaže (Čobić i sur., 1983).

Suha tvar biljke (%)	Udio reducirajućih šećera u suhoj tvari (%)	Udio mliječne kiseline u suhoj tvari (%)	pH silaže
25	9,73	10,49	3,85
30	7,86	9,22	3,92
35	6,2	7,95	3,99
40	4,74	6,67	4,06

Da bi proces siliranja bio uspješno proveden potrebno je zaustaviti disanje biljke, hermetičkim zatvaranjem silirane mase, jer se procesom disanja vrši oksidacija ugljikohidrata, koji su potrebni kao supstrat za mliječno-kisele bakterije. Uspješnost konzerviranja silaže ovisi o procesu zakiseljavanja izazvan mliječno-kiselom fermentacijom. Mliječno-kisele bakterije se najbrže razmnožavaju u anaerobnim uvjetima, a osiguravanjem uvjeta za razmnožavanje mliječno-kiselih bakterija sprječava se razmnožavanje drugih, štetnih mikroorganizama, koji izazivaju kvarenje silaže.

Kukuruzna silaža se osim za ishranu stoke u posljednje vrijeme koristi i u proizvodnji bioplina u postupku anaerobne digestije. Kada se za proces anaerobne digestije koristi homogena mješavina iz dvaju ili više različitih supstrata postupak se naziva kodigestija i to je najčešći način proizvodnje bioplina, primjerice gnojica (pureća, pileća, goveđa) i kukuruzna silaža.

Ostatak koji ostaje nakon izdvajanja zrna kukuruza zove se kukuruzovina. Nakon procesa siliranja kukuruza za ishranu stoke, povećanjem udjela suhe tvari u kukuruzovini, kukuruzovina se također upotrebljava kao sirovina u proizvodnji biogoriva. Kukuruzovina pripada grupi suhih krmiva male hranjive vrijednosti. Ova krmiva sadrže nizak udio

bjelančevina, masti, mineralnih tvari i vitamina, dok imaju visok udio ugljikohidrata, ali su oni slabo probavljivi. Međutim, biološkom predobradom kukuruzovine procesom delignifikacije može se povećati hranjiva vrijednost krmiva. Kemijski sastav kukuruzovine prema različitim autorima prikazan je u **Tablici 2.**

Tablica 2. Kemijski sastav kukuruzovine

Parametar	Udio (%)	Referenca
Suha tvar	94-97	Liew, 2011; Li et al., 2011
Hlapive krutine	88-92	Liew, 2012; Li et al., 2011
Celuloza	31-41	Monlau et al., 2013; Saha, 2003; Lee et al., 2007; Saha et al., 2013; Liew, 2011; Sambusiti, 2012
Hemiceluloza	19-34	Monlau et al., 2013; Saha, 2003; Lee et al., 2007; Saha et al., 2013 ; Liew, 2011; Sambusiti, 2012
Klasonov lignin	14-18	Saha et al., 2013; Liew, 2011; Sambusiti, 2012

S obzirom na mogućnost proizvodnje bioenergije u Hrvatskoj (**Tablica 3.**), tehnološki potencijal kukuruzovine se procjenjuje na 0,37 milijuna tona. Za izračun ukupne proizvodnje na temelju indeksa žetve korištena je prosječna vrijednost za razdoblje od pet godina (2010. – 2014.). Pretpostavka je da 30 % ostataka prilikom obrade kukuruza zaostaje na poljima dok 30 % predstavlja tehnološki potencijal, a ostatak je iskorišten za ishranu stoke.

Tablica 3. Površina i proizvodnja kukuruza u Hrvatskoj za razdoblje od 5 godina (Hrvatski zavod za statistiku, 2015).

		2010.	2011.	2012.	2013.	2014.
Kukuruz	Požnjevena površina (ha)	296768	305130	299161	288365	252567
	Ukupni prinos (t)	2067815	1733664	1297590	1874372	2046 966
	Ukupna proizvodnja (t)	61789	84960	90019	130576	99489

2.2. METODE PREDOBRADE LIGNOCELULOZNOG MATERIJALA

Primarni cilj predobrade lignoceluloze kao tehnološke sirovine u proizvodnji biogoriva je olakšati pristup hidrolitičkim enzimima. U tu svrhu najčešće se koriste fizikalne, kemijske, fizikalno – kemijske i biološke metode. Svaka metoda ima svoj značaj za određenu namjenu iskorištenja biomase (Akintokun i sur., 2014). **Tablica 4.** prikazuje različite metode predobrade lignoceluloznog materijala i u njoj su prikazane prednosti i nedostaci pojedinih metoda.

Tablica 4. Kratki pregled različitih metoda predobrade lignoceluloznog materijala (Hendriks i sur., 2009; Kumar i sur., 2009).

Metode predobrade	Prednosti	Nedostaci
Mljevenje	Ne zahtjeva primjenu kemikalija Ne nastaju štetni produkti degradacije Povećanje dostupne površine	Velika potrošnja energije Očuvana struktura lignina
Obrada koncentriranim kiselinama	Pospješena hidroliza biomase Sinteza inhibitora je minimalna	Visoka cijena kiselina Štetan utjecaj na okoliš Nastanak fenolnih spojeva
Obrada razrijeđenim kiselinama	Niska koncentracija kiseline (< 1%) Kratko vrijeme reakcije	Degradacija jednostavnih ugljikohidrata Nastanak fenolnih spojeva
Alkalna obrada	Niska radna temperatura i tlak Mogućnost korištenja različite vrste biomase Cijepanje veza lignina i veza između lignina i hemiceluloze	Štetan utjecaj na okoliš Potrebna neutralizacija
Organosolv proces	Mogućnost korištenja različite vrste biomase	Visoka cijena organskih otapala Nastanak inhibitornih spojeva Velika potrošnja energije
Parna eksplozija	Hidroliza hemiceluloze Smanjenje kristalnosti celuloze Kratko vrijeme reakcije	Nastanak inhibitornih spojeva
Autohidroliza	Ne zahtjeva primjenu kemikalija Nema štetan učinak na okoliš Otapanje hemiceluloze	Biomasa s niskim udjelom lignina Visoka radna temperatura i tlak

Metode predobrade	Prednosti	Nedostaci
Obrada ionskim kapljevinama	Mogućnost korištenja različite vrste biomase Stabilnost Visoka temperatura vrelišta	Visoka cijena ionskih kapljevina Nastanak inhibitora
Ozonoliza	Degradacija lignina Ne nastaju inhibitorni spojevi	Velika količina ozona Visoki investicijski troškovi
Amonijeva eksplozija	Povećanje dostupne površine Degradacija lignina i hemiceluloze Ne nastaju inhibitorni spojevi	Biomasa s niskim udjelom lignina
Obrada tekućom vrućom vodom	Ne zahtjeva primjenu kemikalija Otapanje hemiceluloze	Nastanak inhibitora Visoka radna temperatura i tlak
Biološka metoda	Niski investicijski troškovi Ne zahtjeva primjenu kemikalija Niski temperaturni uvjeti Ne nastaju toksični produkti Nema štetan učinak na okoliš Razgradnja lignina Minimalan gubitak ugljikohidrata	Dugotrajna metoda

2.2.1. Fizikalne metode predobrade

U fizikalne metode predobrade pripadaju usitnjavanje, parna eksplozija, obrada tekućom vrelom vodom i ekstruzija. Fizikalnom predobradom lignoceluloze se poboljšava dostupnost celuloze i hemiceluloze djelovanju hidrolitičkih enzima. Proces kao što je mljevenje, može rezultirati smanjenjem kristalnosti celuloze, povećanjem dostupne površine celuloze i smanjenje stupnja polimerizacije celuloze čime se olakšava razgradnja lignoceluloznog materijala (Agbor i sur., 2011).

2.2.2. Kemijske metode predobrade

Kemijske metode predobrade lignoceluloze uglavnom uključuju kemikalije kao što su kiseline, lužine i ionske kapljevine. Predobrada lignoceluloze kiselinama može se provoditi razrijeđenim ili koncentriranim kiselinama, a najčešće korištena kiselina je sumporna. Predobradom lignoceluloze s razrijeđenom kiselinom na sobnoj temperaturi, dolazi do hidrolize hemiceluloze čime je postignuta bolja dostupnost celuloze. Kemijskom

predobradom jakim kiselinama učinkovitost hidrolize celuloze, hemiceluloze i lignina se povećava. Nadalje, alkalnom predobradom lignoceluloze razgrađuju se esterske veze u ligninu te dolazi do razgradnje hemiceluloze i celuloze, a najčešće korištena alkalna sredstva su natrij-hidroksid (NaOH), amonijak (NH_3) i urea (Agbor i sur., 2011).

2.2.3. Biološka metoda predobrade

Biološka metoda predobrade se provodi različitim mikroorganizmima. Gljivično predobrađena lignocelulozna biomasa se može koristiti u različite svrhe kao što je poboljšanje probavljivosti stočne hrane, proizvodnja bioetanola, metana i kemikalija. Svaki od navedenih procesa zahtijeva drugačiji izvor lignocelulozne biomase. Glavni cilj biološke predobrade je razgradnja lignina bez ili uz minimalan gubitak ugljikohidrata.

Međutim, iako je biološka predobrada gljivama ekološki i ekonomski prihvatljiva, to je relativno dugotrajan proces u kojem se ugljikohidrati koriste za metabolizam gljiva. Optimizacijom procesa biološke predobrade odabirom najučinkovitijeg soja za razgradnju lignina i sastava podloge, može se smanjiti gubitak ugljikohidrata te skratiti vrijeme zadržavanja lignocelulozne biomase u bioreaktoru (Saritha i sur., 2012). Jedni od najčešće korištenih mikroorganizama u ovu svrhu su gljive bijelog truljenja.

Različite metode predobrade kukuruzovine, procesni uvjeti i učinci svake od metoda prikazani su u **Tablici 5**.

Tablica 5. Kratki pregled različitih metoda predobrade kukuruzovine

Metode predobrade	Procesni uvjeti	Učinci	Referenca
Vodena otopina amonijaka	15 % amonijaka, $T = 170\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 90\text{ min}$	84,86 % - tna konverzija lignina	Kim i sur., 2003
Razrijeđena kiselina	0,07 %, H_2SO_4 , $T = 180\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 30\text{ minuta}$	32,43 % - tna konverzija lignina	Kim i sur., 2003
Kalcij-hidroksid	0,5 g $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 28\text{ dana}$	33,14 % - tna konverzija lignina	Holtzaple i sur., 2005
Anorganske soli	Cijevni reaktor, 0,03 M NaCl, 0,03 M KCl, 0,15 M CaCl_2 , 0,15 M MgCl_2 i 0,10 M FeCl_3 , $T = 160\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20\text{ min}$	100 % - tna konverzija hemiceluloze (postignuta s FeCl_3)	Liu i sur., 2009
Stlačena vruća voda	Kotlasti reaktor, $T = 200\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 24\text{ min}$, protok 10 mL/min	60 % - tna konverzija lignina	Liu i sur., 2005
Vlažna oksidacija	2 g/L Na_2CO_3 , $T = 195\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 15\text{ min}$	60 % - tna konverzija hemiceluloze i 30 % - tna konverzija celuloze	Chen, 2014
Vruća voda	$T = 200\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 20\text{ min}$	12 % - tna konverzija lignina	Liu i sur., 2005
Parna obrada s primjenom katalizatora	3 % SO_2 , $T = 190\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 5\text{ min}$	Ukupni pronos šećera (Glukoza 95,0 %, Ksiloz 91,8 %)	Galbe i sur., 2005
Enzimatska hidroliza	5 mL inokuluma (<i>Coprinus comatus</i>), $t = 72\text{ h}$	43,3 % - tna konverzija lignina	Ma i Ruan, 2015
Biološka obrada	10 mL inokuluma (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>), $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 7\text{ dana}$	11,73 % - tna konverzija lignina	Sasmitaloka i sur., 2016
Obrada ionskim kapljevinama s alkalnom ekstrakcijom	1 % NaOH, $T = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 1\text{ h}$; 1 L butil-3-metilimidazolij klorid, $T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 5\text{ h}$	96 % - tna konverzija lignina	Geng i sur., 2011

2.3. GLJIVE BIJELOG TRULJENJA

Prema mehanizmu razgradnje, gljive koje su aktivne u biorazgradnji drveta, mogu se svrstati u tri skupine, a to su gljive bijelog truljenja, gljive smeđeg truljenja i gljive mekog truljenja. Gljive bijelog i smeđeg truljenja spadaju u porodicu *Basidiomycetes*, dok gljive mekog truljenja spadaju u porodicu *Ascomycetes*. Gljive smeđeg truljenja razgrađuju hemicelulozu i celulozu, a lignin modificiraju. Nakon predobrade materijal je fragmentiran, lako se mrvi (smeđi prah), a najpoznatiji primjer je *Gloeophyllum trabeum*. Gljive mekog truljenja

razgrađuju hemicelulozu i celulozu, dok lignin ne razgrađuju što rezultira nastanku pukotina unutar materijala,. Jedan od primjera je *Daldinia concentrica*. Gljive bijelog truljenja razgrađuju sve komponente lignoceluloze, uključujući lignin, gdje dolazi do obezbojenja materijala (Duraković, 2003).

Gljive bijelog truljenja rastu na drvu kao što su breza, jasika i dr. Međutim, određene vrste, kao što su *Heterobasidion annosum*, *Phellinus Pini*, i *Phlebia radiata* rastu na četinjačama poput smreke i bora. Gljive bijelog truljenja razgrađuju lignin na dva načina, odnosno selektivno i neselektivno. Selektivnost gljiva bijelog truljenja za razgradnju lignina ovisi o vrsti lignoceluloze, vremenu uzgoja i drugim čimbenicima. Primjeri gljiva bijelog truljenja koje posjeduju selektivnu razgradnju su *C. subvermispora*, *Dichomitus squalens*, *P. chrysosporium* i *Phlebia radiata*. Primjeri gljiva bijelog truljenja koje posjeduju neselektivni mehanizam razgradnje lignoceluloze su *Trametes versicolor* i *Fomes fomentarius*. Pri selektivnoj razgradnji lignoceluloze, lignin i hemiceluloza se razgrađuju, a celuloza ostaje nerazgrađena. Neselektivnom degradacijom lignoceluloze, razgrađuju se približno jednake količine celuloze, hemiceluloze i lignina (Isroi i sur., 2011).

Enzimi koji sudjeluju u razgradnji lignina su lignin peroksidaza, lakaza, mangan peroksidaza i versatilna peroksidaza. Gljive bijelog truljenja proizvode razne enzime uključene u razgradnji lignina te celulaze, ksilanaze i druge hemicelulaze. Gotovo sve gljive bijelog truljenja proizvode mangan peroksidazu i lakazu, ali samo neke od njih proizvode lignin peroksidazu. U **Tablici 6.** su prikazani lignolitički enzimi i njihove najvažnije reakcije (Janeš, 2009).

Tablica 6. Lignolitički enzimi i njihove najvažnije reakcije (Janeš, 2009).

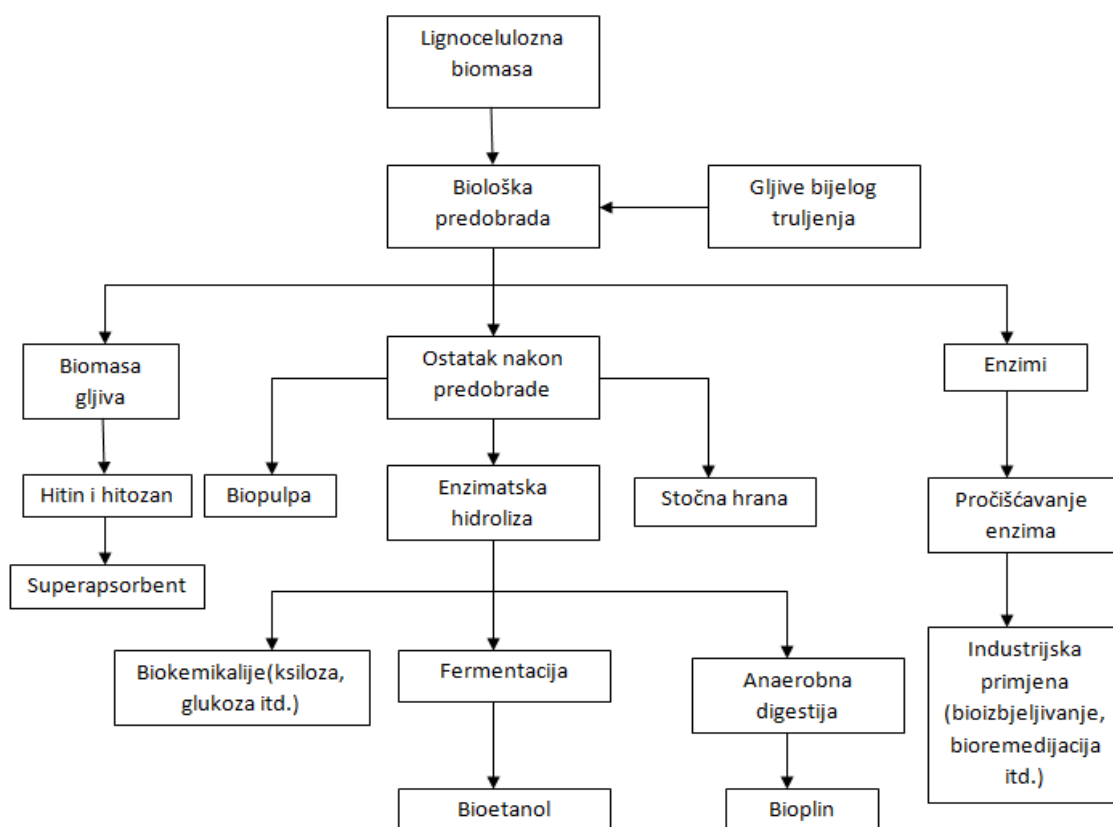
Enzim	Kofaktor	Supstrat	Reakcija
Lignin peroksidaza (LiP)	H ₂ O ₂	Veratrilni alkohol	Oksidacija aromatskog prstena do kationa
Mangan peroksidaza (MnP)	H ₂ O ₂	Mn ²⁺ , organske kiseline, nezasićene masne kiseline	Oksidacija Mn ²⁺ do Mn ³⁺ . Oksidacija fenolnih spojeva
Lakaza	O ₂	<i>o</i> - i <i>p</i> -difenoli, aminofenoli, poliamini, polifenoli, monofenoli, medijatori poput hidroksibenzotirazola	Oksidacija fenola

2.3.1. Primjena gljiva bijelog truljenja

Biorazgradnja lignoceluloze prokariotima ima ekološki značaj, ali biološka razgradnja lignina gljivama, osobito gljivama bijelog truljenja, predstavlja i komercijalnu važnost (Malherbe i Cloete, 2002).

U posljednjih nekoliko godina, istražene su razne metode upotrebe gljiva bijelog truljenja u razgradnji širokog spektra organskih zagađenja okoliša. Nadalje, istraživanja su provedena na razgradnji različitog otpada, uključujući boje, pesticide, policikličke aromatske ugljikovodike, diklorodifeniltrikloroetana, trinitrotoluen, poliklorirani bifenili, klorirani ugljikovodici i druge toksične organske spojeva (Abramson i sur., 2009).

Nadalje, gljive bijelog truljenja se mogu upotrebljavati u obradi industrijskih otpadnih voda kao i u bioremedijaciji onečišćenog tla. Različite industrijske primjene gljiva bijelog truljenja u obradi lignoceluloze prikazane su na **Slici 2** (Isroi i sur., 2011).



Slika 2. Primjene biološke predobrade lignoceluloznog materijala gljivama bijelog truljenja (Isroi i sur., 2011).

Upotreba lignoceluloznih ostataka kao hrane za preživače predstavlja jednu od najstarijih i najraširenijih načina upotrebe biomase (Čobić i sur., 1983). Jedan od najvećih nedostataka siliranja je manipuliranje ogromnom količinom biljne mase s visokim udjelom vlage. Kukuruzna silaža je hranjivo koje je bogato ugljikohidratima, ali je siromašno proteinima i mineralima. Zbog toga se kukuruzna silaža može davati stoci samo u kombinacijama sa ostalim hranjivima i sa dodacima minerala i vitamina. Gljive bijelog truljenja procesom delignifikacije mogu povećati hranjivu vrijednost krmiva. Povećanjem probavljivosti lignoceluloze povećava se i biodostupnost hranjivih tvari (Mandebvu i sur., 1999).

2.3.2. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor, prikazana na **Slici 3**, je gljiva bijelog truljenja iz razreda *Basidiomycetes*, koja proizvodi ekstracelularnu kombinaciju lignolitičkih enzima te učinkovito razgrađuje lignin, policikličke aromatske ugljikovodike, poliklorirane bifenilne smjese i brojna sintetska bojila. *Trametes versicolor* učinkovito provodi delignifikaciju i izbjeljivanje kraft pulpe, učinkovito obezbojuje izljeve nastale izbjeljivanjem pulpe što predstavlja dobar potencijal da bude osnova nove ekološki prihvatljive tehnologije u industriji celuloze i papira (Xavier i sur., 2007).



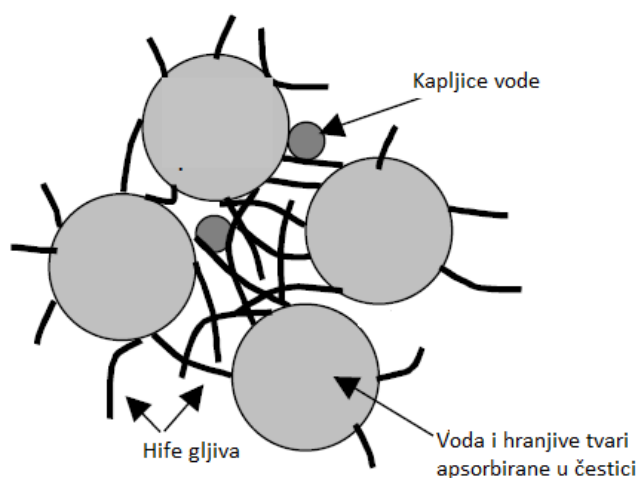
Slika 3. *Trametes versicolor*

(http://www.mykoweb.com/CAF/photos/Trametes_versicolor%28nw-01%29.jpg
[29.01.2015])

2.4. FERMENTACIJA NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Postoje dva načina uzgoja filamentoznih mikroorganizama poput gljiva bijelog truljenja: submerzni uzgoj (eng. *submerged fermentation*, SmF) i uzgoj na čvrstim nosačima (eng. *solid-state fermentation*, SSF). Razlika između submerzne fermentacije i fermentacije na čvrstim nosačima je u količini slobodne vode u supstratu.

Fermentacija na čvrstim nosačima (SSF) se općenito definira kao rast mikroorganizama na čvrstom materijalu u odsutnosti slobodne vode. U posljednjih nekoliko godina, SSF se pokazala obećavajuća u razvoju više različitih bioprocasa (npr. proizvodnja biogoriva). Naime, pojam fermentacija u čvrstom stanju i fermentacija na čvrstim nosačima su često dvosmisleno korišteni. Fermentacija na čvrstim nosačima se treba koristiti za definiranje samo onog postupka u kojemu je sama podloga izvor ugljika/energije (Mitchell i sur., 2004). Za proces fermentacije na čvrstim nosačima često su korišteni proizvodi ili nusproizvodi iz poljoprivrede, šumarstva i prerade hrane. Mikroorganizmi kao što su gljive rastu između dijelova supstrata kao što je prikazano na **Slici 4**. Mikrobnna biomasa može rasti unutar matriksa supstrata ili na površini supstrata.



Slika 4. Rast filamentoznih mikroorganizama između dijelova supstrata u SSF sustavu (Mitchell i sur., 2004).

Pri odabiru bioreaktora za provedbu fermentacije na čvrstim nosačima obavezno je poznavanje morfologije mikroorganizama. Procesne uvijete (temperatura, udio vlage u uzorku, koncentracija inokuluma), dodavanje izvora ugljika i/ili dušika, mineralnih tvari ili

specifičnih enzimskih induktora za rast mikroorganizama i/ili za regulaciju biosinteze metabolita, treba odabrati pažljivo.

Fermentacija na čvrstim nosačima može se provesti u različitim tipovima bioreaktora kao što su bioreaktor s pliticama, bioreaktor s punilima, horizontalni rotirajući bioreaktor, bioreaktor s fluidizirajućim slojem i dr.. Bioreaktor s pliticama predstavlja najjednostavniju tehnologiju SSF, a ovi tipovi reaktora su korišteni dugi niz stoljeća u proizvodnji tradicionalnih fermentiranih namirnica u Kini. Mogu biti izrađeni od različitog materijala kao što su drvo, plastika, bambus i dr..

Međutim, iako su investicijski troškovi minimalni, prilikom provedbe procesa u uvećanom odnosno industrijskom mjerilu dolazi do značajnih problema, kao što su potrebe za velikom površinom plitica jer je maksimalna visina sloja supstrata na plitici 5 cm. Naime, povećanje broja plitica implicira potrebu za ručnim rukovanjem ili visoko sofisticiranim robotskim sustavima (Mitchell i sur., 2004).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti mogućnost upotrebe gljive bijeloga truljenja, *Trametes versicolor* u svrhu razgradnje lignina iz kukuruzovine tijekom uzgoja u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Za određivanje ukupnih i pojedinačnih vlakana u kukuruzovini, korištene su različite metode (određivanje sirovih vlakana prema Weende-u i Wijkstrom-u, određivanje neutralnih detergent vlakana, kiselih detergent vlakana i kiselog detergent lignina prema Van Soest-u).

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Supstrat i mikroorganizam

Svježa kukuruzna silaža odmah nakon žetve (2014.) dobavljena je od tvrtke Bovis d.o.o. (Ivankovo, Hrvatska) i zamrznuta. Udio vlage uzorka dostavljenog u laboratorij bio je 65 %. Iz uzorka su ručno izdvojena zrna kukuruza i takav materijal korišten je dalje za obradu s *T. versicolor*.

Kao radni mikroorganizam za fermentaciju na čvrstim nosačima korištena je gljiva bijelog truljenja, *Trametes versicolor* koja je uzgajana tijekom sedam dana na krumpirovom agaru (PDA) pri 27 °C.

3.2.2. Kemikalije

Korištene kemikalije u ovom istraživanju su: sumporna kiselina, kalij-hidroksid, *n*-oktanol, aceton, natrijev borat dekahidrat, EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), natrijev lauril sulfat, dinatrijev fosfat, natrijev sulfit, cetiltrimetilamonij bromid (CTAB), 2-etoksietanol, kalijev-permanganat, srebrov sulfat, octena kiselina, kalijev acetat, *tert*-butanol, oksalna kiselina, klorovodična kiselina, etanol.

Za potrebe određivanja kemijskog sastava kukuruzovine pripremljene su sljedeće otopine:

neutralna otopina detergenta - u destiliranoj vodi otopljeno je 6,81 g natrijeva borata dekahidrata i 18,61 g EDTA, otopina je grijana na električnom grijaču. Nakon toga dodano je 10 mL 2-etoksietanola i 30 g natrijeva lauril sulfata. 4,56 g dinatrijevog fosfata posebno je otopljeno u destiliranoj vodi, otopina je grijana na električnom grijaču. Nakon posebne pripreme, otopine su pomiješane, a tikvica je nadopunjena do oznake destiliranom vodom.

kisela otopina detergenta - u odmjernu tikvicu dodana je destilirana voda, potrebna količina sumporne kiseline i 20 g cetiltrimetilamonij bromida (CTAB).

puferska otopina - u odmjernu tikvicu dodana je destilirana voda, 6 g željezovog nitrata, 0,15 g srebovog nitrata, 500 mL octene kiseline, 5 g kalijevog acetata i 400 mL *tert*-butanola.

demineralizirana otopina - u odmjernu tikvicu dodano je 250 mL destilirane vode, potrebna količina klorovodične kiseline, 700 mL etanola i 50 g oksalne kiseline.

3.3. METODE

3.3.1. *Priprema kukuruzovine za određivanje kemijskog sastava*

Prije određivanja kemijskog sastava, uzorci kukuruzovine su samljeveni do veličine čestica ispod 1 mm.

3.3.2. *Određivanje kemijskog sastava kukuruzovine*

3.3.2.1 **Udio vlage**

Za određivanja udjela vlage korištena je brza metoda pomoću halogenog vlagomjera (Mettler Toledo HR73, 2011.) prikazanog na **Slici 5**.



Slika 5. Halogeni vlagomjer (Mettler Toledo HR73).

3.3.2.2 Udio proteina

Za određivanje udjela proteina u uzorku korištena je metoda prema Kjeldahl-u. Korištena je koncentrirana sumporna kiselina pri čemu dolazi do degradacije materijala, primjerice ugljik se oksidira do ugljikovog dioksida, vodik do vode, a dušik se reducira do amonijaka koji se destilira vodenom parom i hvata u određeni volumen kiseline poznatog titra, nakon čega je višak kiseline retitiran bazom.

3.3.2.3 Udio pepela

Za određivanje udjela pepela u uzorku korištena je metoda suhog spaljivanja uzoraka u mufolnoj peći pri 550 °C do konstantne mase.

3.3.2.4 Udio masti

Udio masti u uzorcima određen je metodom prema Soxhlet-u. Metoda se temelji na ekstrakciji lipida iz uzorka pomoću organskog otapala. Ekstrakcijom masti po Soxhlet-u određuje se slobodna mast.

Izvagano je 10 g kukuruzovine u odmašćeni tuljac za ekstrakciju koji je potom zatvoren vatom. Nakon toga, tuljac je postavljen u ekstraktor te je spojena tikvica u koju su stavljene 1 - 2 staklene kuglice za vrenje i dodan je potreban volumen otapala etera ili petrol-etera. Nadalje, otapalo je predestilirano, a ekstrakt sakupljan u prethodno vaganoj tikvici. Ekstrakcija je trajala osam sati. Nakon završene ekstrakcije, otapalo je otpareno, a ostatak je sušen 60 minuta pri 103 °C. Uzorak je potom ohlađen i izvagan. Sušenje je ponavljano u intervalima od 30 minuta do konstantne mase.

3.3.2.5 pH vrijednost

Za određivanje pH vrijednosti kukuruzovine korišten je pH – metar (Hanna Instruments 2211 pH/ORP Meter). U svrhu dobivanja vodenih ekstrakata za mjerenje pH, izvagano je 1 g uzorka u 20 mL destilirane vode, te je provedena ekstrakcija 30 minuta pri 22 °C pri 150 rmp.



Slika 6. pH – metar (Hanna Instruments 2211 pH/ORP Meter).

3.3.2.6 Udio vlakana

Za određivanje udjela vlakana u uzorku korišten je uređaj (Velp, 2015) koji je prikazan na **Slici 7.**



Slika 7. Uređaj za određivanje vlakana u uzorku (Velp, 2015).

3.3.3. *Provedba uzgoja *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima*

Uzgoj *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima proveden je u laboratorijskim staklenkama volumena 720 mL. Uzorak kukuruzovine odmrznut je na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata i usitnjen do veličine čestica 1,5 cm - 2 cm, te je izmjerena

vlažnost uzorka. U laboratorijske staklenke je dodano 50 g kukuruzovine i 150 mL destilirane vode. Laboratorijske staklenke su sterilizirane na 121 °C pri tlaku od 1,2 at tijekom 20 minuta, a nakon sterilizacije staklene s uzorcima su ohlađene. Inokulacija je provedena s pet micelijskih plagova promjera 6 mm, pomoću sterilnog bušača čepova. Micelijski plagovi su vorteksirani tijekom jedne minute u 10 mL sterilne vode, potom su micelijski plagovi naciepljeni u prethodno sterilizirane laboratorijske staklenke aseptičkim tehnikama rada. Poklopac svake staklenke je zamijenjen papirnatim ručnikom čime su osigurani aerobni uvjeti. Označene laboratorijske staklenke s uzorcima stavljene su na inkubaciju 30 dana na temperaturi od 27 °C. Staklenke s uzorcima protresane su ručno jednom dnevno tijekom pet minuta. Pokusi su provedeni u tri paralelne serije.

Uzorkovanje je provedeno nakon 10, 20 i 30 dana. Nakon provedbe fermentacije na čvrstim nosačima, laboratorijske staklenke su sterilizirane (121 °C, 20 min), uzorci za analize su samljeveni do veličine čestica ispod 1 mm, a ostatak je zamrznut za daljnju analizu. Gubitak na masi je praćen vaganjem laboratorijskih teglica prije i nakon obrade.

3.3.4. Analitičke metode određivanja kemijskog sastava kukuruzovine tijekom i nakon obrade

3.3.4.1 Određivanje sirovih vlakana prema Weende-u

Metoda se temelji na otapanju ne-celuloznih spojeva sumpornom kiselinom i otopinom kalij-hidroksida. Ovom metodom se određuje udio celuloze u suhoj tvari uzorka.

Izvagano je 1 g uzorka u prethodno pripremljene gučeve (porozitet 40 µm - 60 µm), dodano je 150 mL 1,25 % - tne sumporne kiseline te 3-5 kapi *n*-oktanol. Nakon 30 minuta kuhanja, gučevi su isprani tri puta vrućom destiliranom vodom, zatim je dodana potrebna količina prethodno zagrijanog kalij-hidroksida te nekoliko kapi sredstva protiv pjenjenja. Nakon navedenog otopina je kuhana 10 minuta nakon čega su gučevi isprani hladnom destiliranom vodom te je sadržaj gučeva tri puta ispran sa 25 mL acetona. Zatim su gučevi stavljani na sušenje pri temperaturi od 105 °C tijekom jednog sata.

3.3.4.2 Određivanje sirovih vlakana prema Wijkstrom-u

Metoda se temelji na otapanju ne-celuloznih spojeva sumpornom kiselinom i otopinom kalij-hidroksida. Ovom metodom se određuje udio celuloze u suhoj tvari uzorka.

Izvagano je 1 g uzorka u prethodno pripremljene gučeve (porozitet 40 μm - 60 μm), dodano je 150 mL 6,64 M otopine sumporne kiseline te 3-5 kapi *n*-oktanola. Nakon 10 minuta kuhanja, gučevi su isprani tri puta sa vrućom destiliranom vodom, zatim je dodano 150 mL prethodno zagrijane 0,556 M otopine kalij-hidroksida te 3-5 kapi sredstva protiv pjenjenja. Nakon navedenog otopina je kuhana 10 minuta nakon čega su gučevi isprani hladnom destiliranom vodom te je sadržaj gučeva tri puta ispran sa 25 mL acetona. Zatim su gučevi stavljeni na sušenje pri temperaturi od 105 °C tijekom jednog sata.

3.3.4.3 Određivanje lignina i celuloze kalijevim permanganatom

Metoda se temelji na oksidaciji lignina sadržanog u kiselom detergentu vlakna (ADF), permanganatom s ciljem oslobađanja celuloze.

Izvagano je 1 g uzorka u prethodno pripremljene gučeve (porozitet 40 μm - 60 μm), dodano je 100 ml kisele otopine detergenta pri sobnoj temperaturi i par kapi *n*-oktanola. Zatim je otopina grijana do vrenja te je provedeno refluksiranje u trajanju od 60 minuta. Nakon toga gučevi su isprani s vrućom destiliranom vodom te dva puta sa hladnim acetonom. Nakon toga dodana je potrebna količina miješane otopine kalijevog permanganata te je otopina ostavljena na sobnoj temperaturi 10 minuta (prisutna crvena boja). Zatim je dodana demineralizirane otopine dodana je polako zbog mogućnosti nastanka pjene te je postupak demineralizacije ponovljen (ostatak je trebao biti bijel). Sadržaj gučeva ispran je dva puta sa 80 % - tnim etanolom i dva puta sa acetonom, te su gučevi stavljeni na sušenje pri temperaturi od 105 °C tijekom osam sati.

3.3.4.4 Određivanje neutralnih detergent vlakana prema Van Soest-u

Metoda se temelji na otapanju topljivih ugljikohidrata, pektina, većine proteina, lipida, topljivih mineralnih tvari i silicija. Topljivi sadržaj je definiran kao neutralni detergent topljivih tvari (NDS).

Ostatak se sastoji od vlaknastih dijelova biljnih stanica: hemiceluloze, celuloze, lignina, kutina, netopivih mineralnih tvari i nekih proteina stanične stijenke.

Izvagano je 1 g uzorka u prethodno pripremljene gučeve (porozitet 40 μm - 60 μm), dodana je potrebna količina neutralne otopine detergenta pri sobnoj temperaturi u gučeve zajedno sa natrijevim sulfitom te par kapi *n*-oktanola. Zatim je otopina grijana do vrenja te je provedeno refluksiranje u trajanju od 60 minuta. Nakon toga sadržaj gučeva je tri puta profiltriran i ispran s vrućom destiliranom vodom i dva puta sa hladnim acetonom potom su gučevi stavljeni na sušenje pri temperaturi od 105 °C tijekom osam sati.

3.3.4.5 Određivanje kiselih detergent vlakana prema Van Soest-u

Metoda se temelji na otapanju topljivih ugljikohidrata, pektina, većine proteina, lipida, topljivih mineralnih tvari i hemiceluloze.

Ostatak vlakana se sastoji od celuloze, lignina, kutina i mineralnih tvari netopivih u kiselini te je definiran kao ADF. Razlika između NDF i ADF predstavlja količinu hemiceluloze u uzorku.

Izvagano je 1 g uzorka u prethodno pripremljene gučeve (porozitet 40 μm - 60 μm), dodana je potrebna količina kisele otopine detergenta pri sobnoj temperaturi te par kapi *n*-oktanola. Zatim je otopina grijana do vrenja te je provedeno refluksiranje u trajanju od 60 minuta. Nakon toga je sadržaj gučeva tri puta profiltriran i ispran s vrućom destiliranom vodom te dva puta sa hladnim acetonom a gučevi su stavljeni na sušenje pri temperaturi od 105 °C tijekom osam sati.

3.3.4.6 Određivanje kiselog detergenta lignina prema Van Soest-u

Metoda se temelji na otapanju celuloze sa 72 % sumpornom kiselinom pri čemu ostatak vlakana sadrži lignin s primjesama kutina.

Izvagano je 1 g uzorka u prethodno pripremljene gučeve (porozitet 40 μm - 60 μm), dodana je potrebna količina kisele otopine detergenta pri sobnoj temperaturi i par kapi *n*-oktanola. Zatim je otopina grijana do vrenja te je provedeno refluksiranje u trajanju od 60 minuta. Nakon toga gučevi su isprani s vrućom destiliranom vodom te dva puta sa hladnim

acetonom. Potom je dodana potrebna količina 72 % - tne sumporne kiseline pri sobnoj temperaturi (otapalo za celulozu) te je provedena hladna ekstrakcija tijekom tri sata pri čemu je otopina miješana svakih sat vremena. Zatim su gučevi tri puta profiltrirani i isprani s kipućom vodom, odnosno dokle god je bila prisutna kisela reakcija, nakon navedenog gučevi su stavljeni na sušenje pri temperaturi od 105 °C tijekom osam sati.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. RAZGRADNJA KUKURUZOVINE POMOĆU GLJIVA BIJELOG TRULJENJA

Uzgoj gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* na kukuruzovini proveden je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Eksperimentalno dobiveni podaci prikazani su dijagramima i tablicama. Vrijednosti udjela komponenti lignoceluloze iskazani su kao srednja vrijednost određivanja.

4.1.1. Određivanje kemijskog sastava kukuruzovine prije obrade

Prije početka obrade kukuruzovine s *Trametes versicolor* analiziran je kemijski sastav, a rezultati su prikazani u **Tablici 7**. Dobiveni eksperimentalni podaci su u skladu s podacima dobivenim u različitim istraživanjima, gdje je pokazano da se udio suhe tvari kukuruzovine kreće u rasponu od 85,9 % do 90,6 %, hemiceluloze od 21,7 % do 33,83 %, pepela od 2 % do 10 %, masti od 1,7 % do 2,5 %, pH od 4,2 do 4,8, lignina od 14,3 % do 26,0 %, celuloze od 19,1 % do 40,1 %, proteina od 2,4 % do 9,1 % (Öhgren i sur., 2007; Sasmitaloka i sur., 2016; Geng i sur., 2011; Liu i sur., 2005; Chen i sur., 2012; Kedong i sur., 2015; Pordesimoa i sur., 2005). Razlika u rezultatima posljedica je mnogih faktora, kao što su vremenski uvjeti tijekom uzgoja biljke, zrelost biljke za vrijeme žetve, tehnologija berbe, primijenjene analitičke metode za određivanje vlakana i heterogena priroda samog materijala (Chen, 2014). Štoviše, vrlo je teško precizno analizirati udio lignina zbog njegove netopljivosti. Prinos suhe tvari cijele biljke kukuruza ovisi o berbi kukuruza u odgovarajućoj fazi zrelosti (Kedong i sur., 2015).

Tablica 7. Kemijski sastav kukuruzovine prije biološke obrade s *Trametes versicolor*.

Parametar	Vrijednosti	Mjerna jedinica
Suha tvar	9,53	%
Pepeo	3,02	% s. tv.
Hlapive tvari	96,98	% s. tv.
Masti	2,32	% s. tv.
Celuloza (metoda prema Weende-u, Wijkstrom-u i određivanje celuloze permanganatom)	22,41 - 13,97 - 19,11	% s. tv.
Hemiceluloza (Razlika između NDF-a i ADF-a, metoda prema Van Soest-u)	25,94	% s. tv.
Klasonov lignin (metoda prema Van Soest-u)	26,10	% s. tv.
pH	4,11	-
Proteini	6,26	% s.tv.

4.1.2. Provedba procesa predobrade kukuruzovine

Kao što je poznato iz literature, gljive bijelog truljenja rastu u temperaturnom intervalu od 15 °C do 35 °C, međutim, proces delignifikacije je optimalan na temperaturi između 25 °C i 30 °C. Provedbom uzgoja *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, morfologija kolonija se mijenja tijekom vremena provedbe fermentacije. Nakon 20 dana trajanja fermentacije primijećen je rast *T. versicolor* u obliku dugih, tankih i bijelih niti. Kemijski sastav kukuruzovine (udio vlage, hlapivih tvari, pepela, slobodnih masnih kiselina, te pH) nakon procesa obrade u laboratorijskim teglicama prikazan je u **Tablici 8**. Analiza vlakana prikazana je u poglavljima 4.1.3. - 4.1.8. Udio vlage tijekom provedbe fermentacije se neznatno povećava, ali je i dalje optimalan za rast *T. versicolor* (75 – 85 %), što se slaže s literaturnim podacima (Chen, 2014). Ovo opažanje se može objasniti na način da je generiranje metaboličke vode bilo veće od isparavanja vode tijekom provedbe procesa fermentacije. Provedbom uzgoja *T. versicolor* može doći do značajnog povećanja ekstrahiranih spojeva kao što su jednostavni šećeri, voskovi, spojevi s dušikom i dr., posljedica čega je povećanje udjela pepela, slobodnih masnih kiselina i proteina. Stupanj kiselosti je jedan od najboljih kriterija za ocjenu kvalitete kukuruzne silaže, a optimalan pH je između 3,5 - 4,2. Ako je pH iznad 5,0 znači da silaža nije dovoljno kisela tj. da nije dovoljno prevrela, međutim, ako je pH oko 2,0 ona je prekisela. pH vrijednost svježeg uzorka kukuruzovine dobivena u ovom istraživanju (pH 4,11) je optimalna.

Tablica 8. Kemijski sastav kukuruzovine nakon provedbe biološke obrade s *Trametes versicolor*.

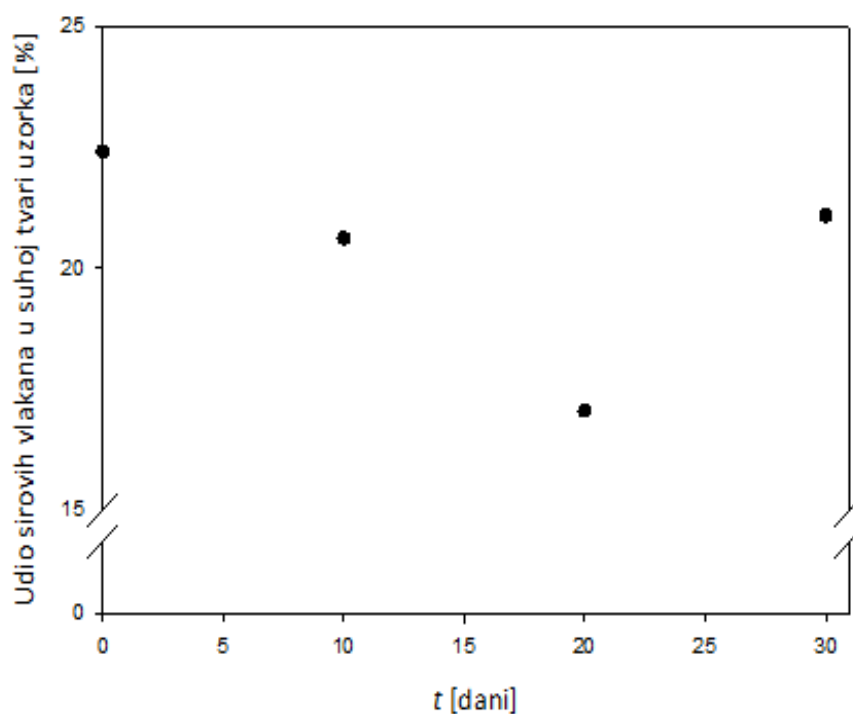
Parametar	Vrijednosti	Mjerna jedinica
Suha tvar	9,57	%
Pepeo	5,27	% s. tv.
Hlapive tvari	94,73	% s. tv.
Slobodne masne kiseline	3,29	% s. tv.
Celuloza (metoda prema Weende-u, Wijkstrom-u i određivanja celuloze permanganatom)	21,08 - 20,10 - 50,92	% s. tv.
Hemiceluloza (Razlika između NDF-a i ADF-a, metoda prema Van Soest-u)	0	% s. tv.
Klasonov lignin (metoda prema Van Soest-u)	14,78	% s. tv.
pH	4,8	-
Proteini	7,03	% s. tv.

4.1.3. Udio sirovih vlakana prema Weende-u

U **Poglavlju 3.3.1.1.** navedeno je da se metodom prema Weende-u određuje udio celuloze u suhoj tvari uzorka. Početni uzorak (koji nije predobrađen gljivom bijelog truljenja *T. versicolor*) sadrži 22,41 % celuloze po suhoj tvari uzorka. Na **Slici 8** je vidljivo da nakon 10. dana provedbe fermentacije na čvrstim nosačima dolazi do smanjenja udjela celuloze odnosno postignuta je 8,03 % - tna konverzija celuloze. Isti trend je vidljiv nakon 20 dana trajanja fermentacije gdje je postignuta konverzija od 23,96 %. Eksperimentalno dobiveni podaci u ovom istraživanju se slažu s literaturnim podacima. Primjerice, López i sur., 2013 su također zabilježili jednaki trend smanjenja nakon provedbe fermentacije na čvrstim nosačim tijekom 21 dan, a kao radni mikroorganizam korišten je *Phanerochaete flavidio-alba*. Naime, kao supstrat su koristili kukuruzovinu gdje je postignuta 10,16 % - tna konverzija celuloze, pšeničnu slamu gdje je konverzija celuloze iznosila 9,96 % i drvena vlakna gdje je postignuta 7,6 % - tna konverzija celuloze.

Međutim, iz rezultata prikazanih na **Slici 8** vidljivo je da nakon provedbe fermentacije u trajanju od 30 dana dolazi do povećanje udjela celuloze, te udio celuloze iznosi 21,08 %. Ovo opažanje možemo objasniti na temelju topljivosti hemiceluloznih spojeva u silaznom redoslijedu: manosa, ksiloza, glukoza, arabinoza, i galaktoza, a povećavanjem temperature povećava se topljivost navedenih spojeva. Otapanje komponenti lignoceluloze ne ovisi samo o temperaturi nego i drugim aspektima kao što su sadržaj vlage i pH. Štoviše, topljivost viših

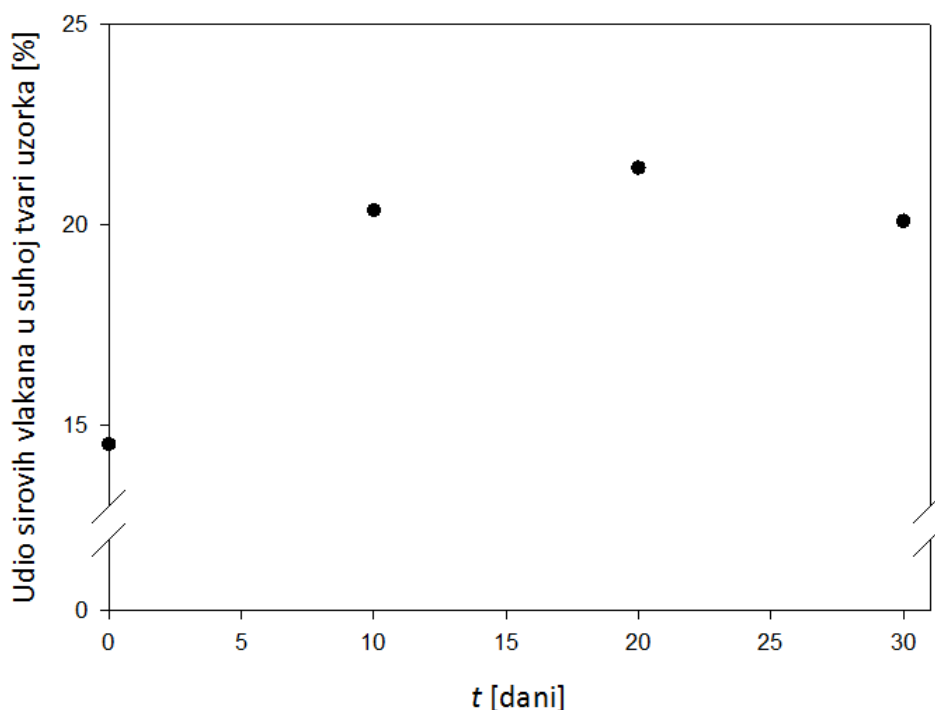
molekularnih polimera ne može se predvidjeti, zbog nepoznate točke taljenja (Hendriks i sur., 2009). Tijekom predobrade lignoceluloze, većina netopljive hemiceluloze se uklanja sa površine celuloznih mikrovlakana u razne topljive oligosaharide. Kao što je već spomenuto, glavni lanac hemiceluloze, ksilan, se sastoji od međusobno povezanih jedinica 1,4- β -D-ksilopiranoze. Naime, korištena sumporna kiselina otpušta vodikov ion uzrokujući depolimerizaciju hemiceluloze selektivnom hidrolizom glikozidnih veza, oslobađajući O-acetilne skupine i druge karboksilne ostatke posljedica čega je nastajanje octene i uronske kiseline. Oslobađanje navedenih kiselina se smatra da katalizira hidrolizu hemiceluloze, odnosno acetilne skupine kataliziraju depolimerizaciju ksilana. Drugi dio acetil estera je ostao kovalentno vezan za ksilan, posljedica čega je nastajanje esterificiranih ksilo-oligomera (Pu i sur., 2013).



Slika 8. Udio sirovih vlakana u uzorku pri različitom trajanju fermentacije prema Weende-u

4.1.4. Udio sirovih vlakana prema Wijkstrom-u

U **Poglavlju 3.3.4.2.** navedeno je da se metodom prema Wijkstrom-u određuje udio celuloze u suhoj tvari uzorka. Početni uzorak određivan metodom prema Wijkstrom-u sadrži 13,97 % celuloze po suhoj tvari uzorka, dok početni uzorak određivan metodom prema Weende-u sadrži 22,41 % celuloze po suhoj tvari uzorka, čime je pokazano da odabir metode određivanja udjela celuloze ima značajan utjecaj na rezultat. Iz rezultata prikazanih na **Slici 9** vidljivo je da nakon 10. dana i 20. dana provedbe fermentacije dolazi do povećanja udjela celuloze (20,37 % i 21,43 %), a nakon 30. dana dolazi do neznatnog smanjenja udjela celuloze (20,1 %). Naime, zapaženo povećanje je posljedica korištenja koncentriranije kiseline čime je skraćeno vrijeme kuhanja otopine, za razliku od metode prema Weende-u. Kao što je već spomenuto, sumporna kiselina otpušta vodikov ion uzrokujući depolimerizaciju hemiceluloze, posljedica čega je nastajanje esterificiranih ksilo-oligomera (Pu i sur., 2013).



Slika 9. Udio sirovih vlakana u uzorku pri različitom trajanju fermentacije prema Wijkstrom-u

4.1.5. Udio celuloze određivane kalijevim permanganatom

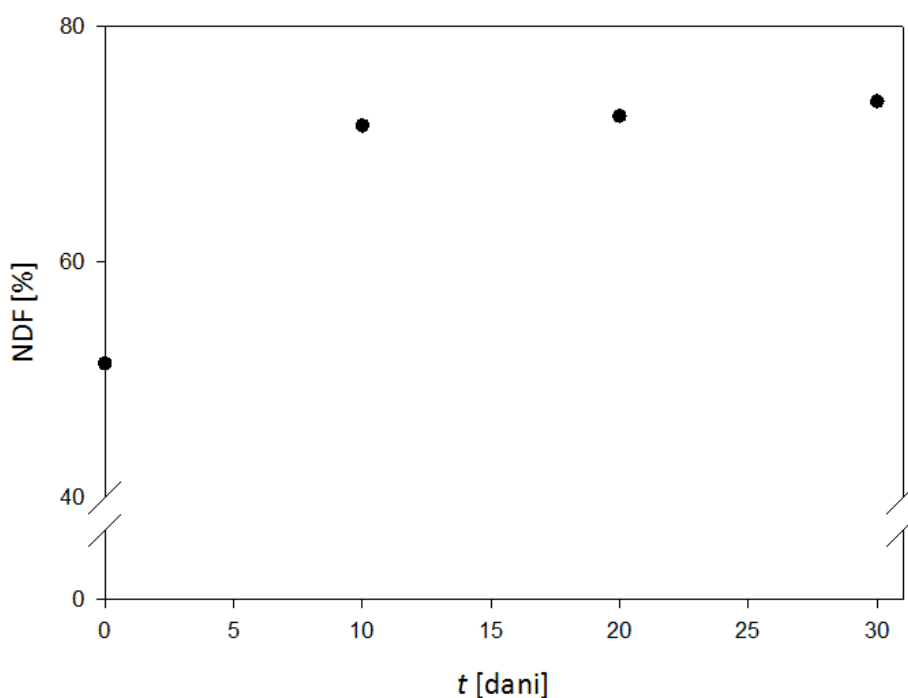
U **Poglavlju 3.3.4.3.** je navedeno da se metoda određivanja celuloze kalijevim permanganatom temelji na oksidaciji lignina sadržanog u kiselom detergentu vlakna (ADF), permanganatom s ciljem oslobađanja celuloze. Iz rezultata prikazanih u **Tablici 9** vidljivo je da nakon 10. dana dolazi do povećanja udjela celuloze što znači da je postignuta veća probavljivost obrađene kukuruzovine u usporedbi s neobrađenom. Međutim, nakon 20. dana dolazi do blagog smanjenja udjela celuloze. Ovo opažanje možemo objasniti na način da je celuloza iskorištena za rast biomase. Nakon 30. dana provedbe fermentacije dolazi do ponovnog povećanja udjela celuloze, a samim time i do povećanja probavljivosti kukuruzovine. Udio celuloze u kukuruzovini prema literaturi se kreće u rasponu od 19,1 % do 40,1 % (Sasmitaloka i sur., 2016). U ovom istraživanju udio celuloze u neobrađenom uzorku metodom prema Weende-u iznosi 22,41 %, metodom prema Wijkstrom-u 13,97 %, dok udio celuloze određivan permanganatom iznosi 19,11 %. S obzirom na dobivene rezultate vidljivo je da udio celuloze dobiven metodom prema Wijkstrom-u odstupa od rezultata navedenih u literaturi, što bi moglo značiti da ova metoda nije prikladna za određivanje udjela celuloze u kukuruzovini. Dobiveni eksperimentalni podaci udjela celuloze tijekom i nakon provedbe fermentacije određivani metodom prema Weende-u pokazuju smanjenje udjela celuloze do 20. dana trajanja fermentacije, a nakon 30. dana povećanje udjela. Obradom uzorka kiselinom može doći do depolimerizacije hemiceluloze. Naime, iz svega navedenog može se zaključiti da određivanjem udjela celuloze permanganatom je najprikladnija metoda jer se udio celuloze određuje iz ADF-a koji sadrži samo celulozu i lignin, te druge lignocelulozne komponente ne mogu utjecati na dobivene rezultate kao što je to slučaj kod metode prema Weende-u.

Tablica 9. Udio celuloze određivane različitim metodama prije i nakon provedbe fermentacije na čvrstim nosačima.

Provedba fermentacije (dani)	Udio celuloze u s.tv. uzorka (%) prema Weende-u	Udio celuloze u s.tv. uzorka (%) prema Wijkstrom-u	Udio celuloze u s.tv. uzorka (%) prema metodi određivanja celuloze permanganatom
0	22,41	13,97	19,11
10	20,61	20,37	40,98
20	17,04	21,43	37,10
30	21,08	20,10	50,92

4.1.6. Udio neutralnih detergent vlakana prema Van Soest-u

U **Poglavlju 3.3.4.4.** navedeno je da se metodom prema Van Soest-u određuje udio hemiceluloze, celuloze, lignina i kutina u suhoj tvari uzorka. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da početni uzorak sadrži 51,36 % NDF-a u suhoj tvari uzorka. Dobiveni podaci su u skladu s literaturnim podacima u kojima je zabilježen da optimalan udio NDF-a iznosi od 50 % do 55 %, ukoliko se kukuruzna silaža koristi za ishranu stoke (Čobić i sur., 1983). Iz rezultata prikazanih na **Slici 10** vidljivo je da nakon 10. dana trajanja fermentacije dolazi do povećanja NDF-a, a udio NDF-a iznosi 71,58 %. Jednaki trend je zapažen nakon 20. i 30. dana, kad udio NDF-a iznosi 72,40 %, odnosno 73,64 %.



Slika 10. Udio neutralnih detergent vlakana u suhoj tvari uzorka pri različitom trajanju fermentacije prema Van Soest-u

Dobiveni rezultati su uspoređeni s rezultatima iz literature. U istraživanju Kerley i sur., 1986 provedena su dva eksperimenta, a izvedena su pomoću četiri više-kanuliranih ovaca (srednje tjelesne težine 65 kg) u svrhu određivanja učinka predobrade pšenične slame s alkalnom otopinom (pH 11,5) vodikovog peroksida (0,26 g vodikov peroksid / g pšenične slame) na mjesto i opseg probave u ovaca. Hranjivo je sadržavalo od 33 % do 37 % suhe tvari (niski udio

suhe tvari pšenične slame) i od 70 % do 72 % suhe tvari (visoki udio suhe tvari pšenične slame). Predobrađom pšenične slame s peroksidom došlo je povećanja kiselih detergent vlakana i celuloze te smanjena kiselog detergenta lignina (ADL) u odnosu na neobrađenu pšeničnu slamu. Jednaki trend je zabilježen u istraživanju provedenom u ovom diplomskog radu, gdje je kukuruzovina biološki predobrađena s *T. versicolor*, a usporedni prikaz rezultata je prikazan u **Tablici 10**.

Tablica 10. Usporedni prikaz kemijskog sastava pšenične slame (Kerley i sur., 1986) i kukuruzovine iz Osatina grupe d.o.o. prije i nakon predobrade.

Eksperiment 1.	Netretiran uzorak pšenične slame (s.tv. 33 - 37 %)	Tretiran uzorak pšenične slame (s.tv. 33 - 37 %)	Netretiran uzorak kukuruzovine (% s.tv.)	Tretiran uzorak kukuruzovine (% s.tv.)
<i>NDF</i>	49,5	46,5	51,36	73,64
<i>ADF</i>	30,0	30,4	25,43	76,65
<i>Celuloza</i>	21,9	30,2	19,11	50,92
<i>ADL</i>	4,6	3,1	26,10	14,78
Eksperiment 2.	Netretiran uzorak pšenične slame (s.tv. 70 - 72 %)	Tretiran uzorak pšenične slame (s.tv. 70 - 72 %)	Netretiran uzorak kukuruzovine (% s.tv.)	Tretiran uzorak kukuruzovine (% s.tv.)
<i>NDF</i>	65,6	63,6	51,36	73,64
<i>ADF</i>	44,1	58,2	25,43	76,65
<i>Celuloza</i>	32,2	51,1	19,11	50,92
<i>ADL</i>	6,5	4,0	26,10	14,78

Kada je pšenična slama predobrađena, ovce mogu probaviti više suhe tvari, neutralnih detergent vlakana i celuloze u želucu, tankom i debelom crijevu. Provedba procesa predobrade je bila uspješna u svladavanju glavnih prepreka za mikrobnu razgradnju pšenične slame u gastrointestinalnom traktu ovaca, a rezultati probavljivosti su prikazani u **Tablici 11**. Mikroorganizmi prisutni u buragu ovce mogu razgraditi amorfnu celulozu, ali ne i kristaličnu, a pokazano je da korištenjem predobrađene pšenične slame ovce mogu razgraditi vlaknasti materijal. U tankom crijevu je veća probavljivost NDF-a kada su ovce hranjene obrađenom pšeničnom slamom, zbog veće podložnosti bakterijske populacije tankog crijeva. Dobivene rezultate u **Tablici 11** možemo usporediti s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju gdje je primijećen jednaki trend porasta udjela NDF-a, ADF-a i celuloze te smanjenje udjela lignina. Primjerice netretirana pšenična slama u eksperimentu 2. sadrži 51,6 % NDF-a, a netretirana

kukuruzovina sadrži 51,36 % NDF-a, dok tretirana pšenična slama sadrži 72,9 % NDF-a, tretirana kukuruzovina sadrži 73,64 % NDF-a. Isto tako, udio ADF-a u netretiranom uzorku pšenične slame iznosi 44,1 %, a netretiran uzorak kukuruzovine sadrži 25,43 %, dok tretirana pšenična slama sadrži 58,2 % ADF-a, tretiran uzorak kukuruzovine sadrži 76,65 % ADF-a. Budući da su u istraživanju Kerley i sur., 1986 mjerili probavljivost pšenične slame kod ovaca dobiveni su približno jednaki rezultati kao u ovom istraživanju, što znači da se obradom s *T. versicolor* postiže bolja probavljivost kukuruzovine, te bi se ovako predobrađena kukuruzovina mogla koristiti u prehrani stoke.

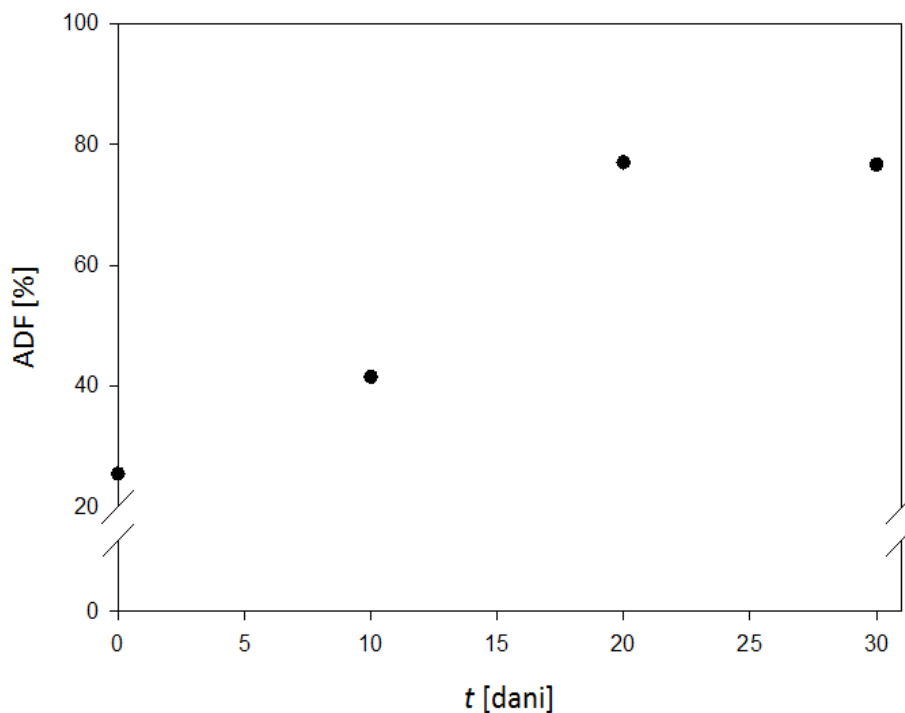
Tablica 11. Probavljivost suhe tvari, neutralnih detergent vlakana i celuloze, tretiranog i netretiranog uzorka u dva različita eksperimenta (Kerley i sur., 1986).

Eksperiment 1. Probavljivost u želucu (%)	Netretiran uzorak (s.tv. 33 - 37 %)	Tretiran uzorak (s.tv. 33 - 37 %)	Netretiran uzorak (s.tv. 70 % - 72 %)	Tretiran uzorak (s.tv.70 % - 72 %)
NDF	51,5	65,6	37,2	68,8
s.tv.	51,6	54,8	20,0	47,4
Celuloza	45,2	66,6	40,7	74,2
Probavljivost u tankom crijevu (%)				
NDF	-1,2	11,2	3,5	7,3
s.tv.	8,5	21,5	15,3	17,3
Celuloza	1,1	11,6	1,7	6,5
Probavljivost u debelom crijevu (%)				
NDF	3,6	5,0	1,4	5,0
s.tv.	8,3	6,7	14,7	10,1
Celuloza	4,0	7,1	5,1	6,2
Ukupna probavljivost				
NDF	53,9	81,8	42,1	81,0
s.tv.	68,4	83,0	50,0	74,8
Celuloza	50,2	85,2	47,6	86,9
Eksperiment 2. Ukupna probavljivost				
NDF	49,4	78,6	51,6	72,9
s.tv.	68,4	82,7	58,0	70,7
Celuloza	53,8	78,0	37,5	84,0

U istraživanju Sánchez i sur., 2007 su korišteni *Aspergillus oryzae* i *Rhizopus oligosporus* za provedbu procesa fermentacije na čvrstim nosačima, kao supstrat korišten je ostatak iz proizvodnje viskija (ječmeni slad i kukuruz). Prije provedbe fermentacije s *Rhizopus oligosporus*, udio neutralnih detergent vlakana (NDF) iznosi 46,1 %, a nakon provedbe 39,5 %, gdje dolazi do smanjenja NDF-a, odnosno konverzije od 14,3 %. Koristeći kao radni mikroorganizam *Aspergillus oryzae* udio NDF-a prije provedbe fermentacije iznosi 45,2 %, a nakon provedbe provedbe fermentacije došlo je do povećanja NDF-a, u iznosu od 45,3 %.

4.1.7. Udio kiselih detergent vlakana prema Van Soest-u

U **Poglavlju 3.3.4.5.** navedeno je da se metodom prema Van Soest-u određuje udio celuloze, lignina i kutina u suhoj tvari uzorka. Prema dobivenim rezultatima, vidljivo je da početni uzorak sadrži 25,43 % ADF-a u suhoj tvari uzorka. Dobiveni eksperimentalni podaci su u skladu s literaturnim podacima, gdje je pokazano da se udio ADF-a u kukuruzovini kreće u rasponu od 23,9 % do 28,3 % (Hunt i sur., 1992). Iz rezultata prikazanih na **Slici 11** vidljivo je znatno povećanje ADF-a već nakon 10. dana trajanja fermentacije, odnosno, udio ADF-a iznosi 41,48 %. Jednaki trend je primijećen nakon 20. i 30. dana obrade, gdje je udio ADF-a približno jednak (76,78 % i 76,65 %). Na osnovu povećanja udjela ADF-a može se zaključiti da dolazi do povećanja probavljivosti kukuruzovine.



Slika 11. Udio kiselih detergent vlakana u suhoj tvari uzorka pri različitom trajanju fermentacije prema Van Soest-u

Prema dobivenim rezultatima, u **Tablici 12** vidljivo je da početni uzorak sadrži 25,94 % hemiceluloze u suhoj tvari uzorka. Dobiveni eksperimentalni podaci su u skladu s literaturnim podacima, gdje je pokazano da se udio hemiceluloze u kukuruzovini kreće u rasponu 21,7 % do 33,83 % (Öhgren i sur., 2007). Nadalje, provedbom fermentacije u trajanju od 10 dana vidljiv je porast udjela hemiceluloze, te udio hemiceluloze iznosi 41,10 %. Ovo opažanje možemo objasniti na način da obradom kukuruzovine s *T. versicolor* dolazi do razgradnje stanične stijenke, pri čemu dolazi do poboljšanja probavljivosti lignoceluloznog materijala. Međutim, nakon 20. i 30. dana dolazi do smanjenja udjela hemiceluloze, odnosno do potpune hidrolize hemiceluloze iz stanične stijenke kukuruzovine već nakon 10. dana provedbe fermentacije.

Tablica 12. Udio hemiceluloze u suhoj tvari uzorka tijekom i nakon provedbe fermentacije na čvrstim nosačima.

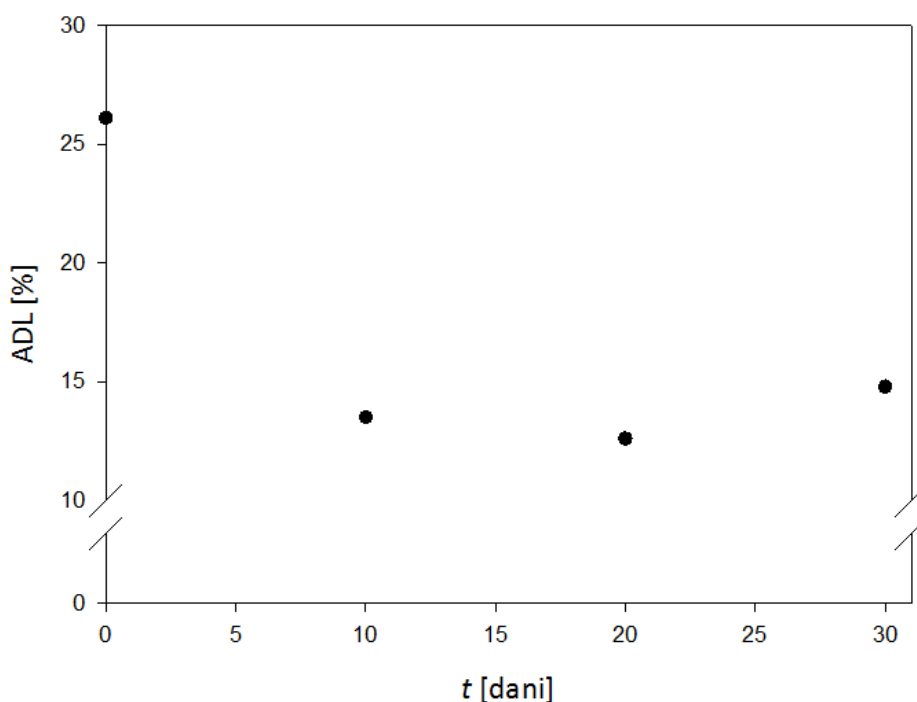
Provedba fermentacije (dani)	Hemiceluloza (%)
0	25,94
10	30,10
20	0
30	0

U istraživanju Sánchez i sur., 2007, korišteni su *Aspergillus oryzae* i *Rhizopus oligosporus* za provedbu procesa fermentacije na čvrstim nosačima, kao supstrat korišten je ostatak iz proizvodnje viskija (ječmeni slad i kukuruz). Prije provedbe fermentacije s *Rhizopus oligosporus*, udio kiselih detergent vlakana (ADF) iznosi 17,8 %, a nakon provedbe obrade udio ADF-a je 16,7 %, odnosno došlo je do smanjenja ADF-a, tj. konverzije od 6,2 %. Koristeći kao radni mikroorganizam *Aspergillus oryzae* udio ADF-a prije provedbe fermentacije iznosi 16,8 %, a nakon provedbe fermentacije došlo je do povećanja ADF-a, te udio ADF-a iznosi 20,1 %. Budući da je udio ADF-a u početnom uzorku i u uzorku nakon provedbe fermentacije približno jednak, znači da navedeni mikroorganizam ne razgrađuje celulozu i lignin.

4.1.8. Udio kiselog detergenta lignina prema Van Soest-u

Polimer lignin je glavna prepreka za korištenje lignoceluloznog materijala kao sirovine za proizvodnju biogoriva. Shodno tome, biološkom predobradom lignoceluloze bi se olakšao pristup hidrolitičkim enzimima u kasnijem procesu proizvodnje bioplina, uzrokujući fragmentaciju lignina (Chen, 2014). Kao što se primijeti na **Slici 6**, gdje su prikazani rezultati mjerenja udjela kiselog detergenta lignina prema Van Soest-u, u ovom istraživanju je nakon 20. dana trajanja fermentacije postignuta 51,74 % - tna konverzija lignina. Isto tako može se primijetiti da već nakon 10. dana provedbe fermentacije dolazi do značajnog smanjenja udjela lignina odnosno do 48,28 % - tne konverzije lignina. Međutim, nakon provedbe fermentacije u trajanju od 30 dana dolazi do povećanja udjela lignina, a udio lignina iznosi 14,78 %. Naime, ovo opažanje se može objasniti na način da je povećanje udjela lignina posljedica složenog metabolizma gljiva bijelog truljenja i njihove lignolitičke aktivnosti. Međutim, heterogena priroda lignoceluloze i snažna adsorpcija gljiva bijelog truljenja može

utjecati na postupak uzorkovanja kao i na samu analitičku metodu određivanja kemijskog sastava materijala, pa tako i udjela lignina.



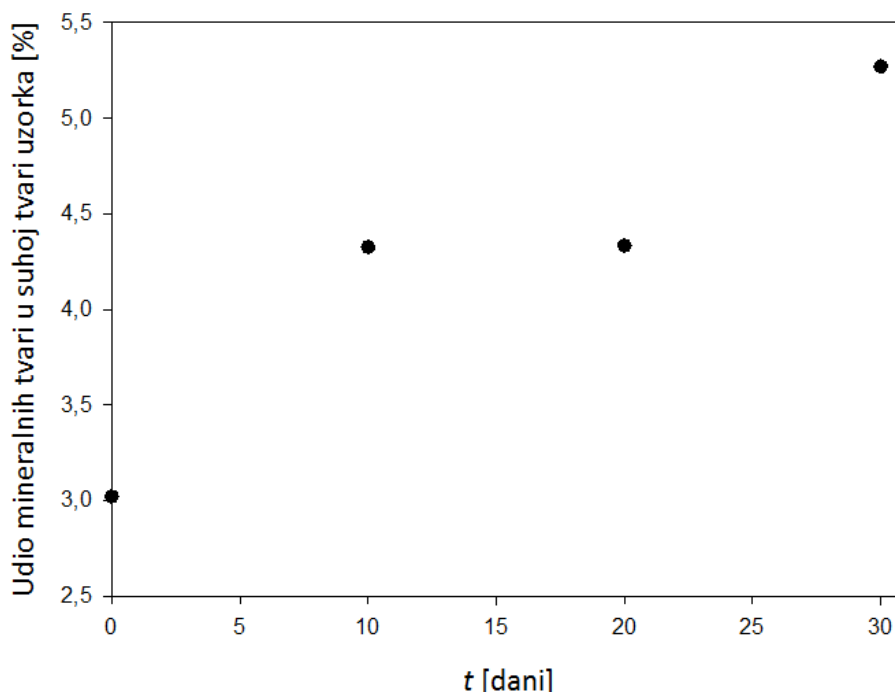
Slika 12. Udio kiselog detergenta lignina u suhoj tvari uzorka pri različitom trajanju fermentacije prema Van Soest-u

Jednaki trend, tijekom provedbe procesa predobrade zabilježen je mnogim istraživanjima. Primjerice, Ma i Ruan, 2015, su također kao supstrat koristili kukuruzovinu, koju su enzimatski (korišten mikroorganizam je *Coprinus comatus*) tretirali tijekom 72 h, gdje je postignuta 43,3 % - tna konverzija lignina. López i sur., 2013 su također zabilježili jednaki trend nakon provedbe fermentacije na čvrstim nosačim tijekom 21 dan, a kao radni mikroorganizam korišten je *Phanerochaete flavido-alba*. Naime, kao supstrat su koristili kukuruzovinu gdje je postignuta 23,46 % - tna konverzija lignina, pšenična slama gdje je konverzija lignina iznosila 18,75 % i drvena vlakna gdje je postignuta 22,6 % - tna konverzija lignina. Xiao i sur., 2011 su u pokusima predobrade tamarisa s vrućom stlačenom vodom pri 200 °C tijekom tri sata zabilježili povećanje udjela lignina sa 23,5 % na 40,1 %. Dobiveni rezultat udjela lignina je veći nego u netretiranom uzorku, a povećanje su objasnili na način da tijekom predobrade tamarisa uz heterogenu prirodu korištenog materijala, vjerojatno

dolazi do depolimerizacije materijala ili do formiranja kondenzacijskih produkata tijekom predobrade materijala.

4.1.9. Udio mineralnih tvari u suhoj tvari uzroka

Količina mineralnih tvari u kukuruzovini se izražava kao količina pepela koji se određuje spaljivanjem pri 550 °C. Početni uzorak sadrži 3,02 % mineralnih tvari, a dobiveni rezultat je u skladu s literaturnim podacima gdje je pokazano da se udio mineralnih tvari u kukuruzovini kreće u rasponu od 2 % do 10 % (Öhgren i sur., 2007). Iz rezultata prikazanih na **Slici 13** može se primijetiti povećanje udjela mineralnih tvari tijekom provedbe fermentacije u laboratorijskim teglicama. Nakon 10. dana udio mineralnih tvari iznosi 4,33 %, 20. dana trajanja fermentacije udio pepela ostao je nepromijenjen, a nakon 30. dana dolazi do povećanja udjela pepela, te udio pepela iznosi 5,27 %. Pojedini poljoprivredni ostaci mogu imati sadržaj pepela iznad 15 %, a na sadržaj pepela poljoprivrednih ostataka djelomično može utjecati onečišćenja iz tla (López i sur., 2013). Obradom s *T. versicolor* dolazi do povećanja udjela pepela što je poželjno jer biljka kukuruza i silaža od nje sadrži nedovoljne količine makroelemenata i mikroelemenata.



Slika 13. Udio mineralnih tvari u suhoj tvari uzorka

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka koji su dobiveni ovim istraživanjem mogu se izvesti temeljni zaključci istraživanja:

Kukuruzovina korištena u ovom istraživanju sastoji se od vlakana lignina, celuloze i hemiceluloze (51,4 % s.tv.), proteina (6,26 % s.tv.), slobodnih masti (2,32 % s.tv.), pepela (3,02 % s.tv.), hlapivih tvari (96,98 % s.tv.), vlage (9,53 % s.tv.).

U svrhu analize sastava vlakana u lignoceluloznim materijalima postoje različite metode: metoda prema Weende-u i Wijkstrom-u (određivanje udjela celuloze), određivanje udjela celuloze permanganatom, određivanja neutralnih detergent vlakana prema Van Soest-u (određivanje udjela hemiceluloze, celuloze, lignina), određivanja kiselih detergent vlakana prema Van Soest-u (određivanje udjela celuloze i lignina), te određivanje kiselog detergent lignina prema Van Soest-u.

Istraživanjem utjecaja tri različite metode na mjerenje udjela celuloze (metoda prema Weende-u i Wijkstrom-u i metoda s permanganatom) pokazano je da je korištenjem koncentrirane kiseline (prema metodi po Wijkstrom-u) postignut niži udio celuloze (13,97 %) u odnosu na metode u kojima je korištena razrijeđena otopina (prema metodi po Weende-u) kada udio celuloze iznosi 22,41 %, te metoda s kalijevim permanganatom, kada udio celuloze iznosi 19,11 %.

Obradom kukuruzovine s *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima dobiveni su sljedeći rezultati:

- nakon 10. dana obrade došlo je do povećanja udjela vlage, pepela, proteina, slobodnih masti, hemiceluloze (razlika između NDF-a i ADF-a, metoda prema Van Soest-u), celuloze (metoda određivanja udjela celuloze permanganatom, metoda prema Wijkstrom-u), neutralnih detergent vlakana i kiselih detergent vlakana (metoda prema Van Soest-u) te smanjenja udjela celuloze (metoda prema Weende-u) i lignina (metoda prema Van Soest-u).
- nakon 20. dana obrade došlo je do povećanja udjela vlage, pepela, proteina, slobodnih masti, celuloze (metoda prema Wijkstrom-u), neutralnih detergent vlakana i kiselih detergent vlakana (metoda prema Van Soest-u) te smanjenja udjela celuloze (metoda određivanja udjela celuloze permanganatom, metoda prema Weende-u), lignina (metoda prema Van Soest-u) i hemiceluloze (razlika između NDF-a i ADF-a, metoda prema Van Soest-u).

- nakon 30. dana obrade došlo je do povećanja udjela vlage, pepela, proteina, slobodnih masti, celuloze (metoda određivanja udjela celuloze permanganatom, metoda prema Weende-u), neutralnih detergent vlakana i kiselih detergent vlakana (metoda prema Van Soest-u) i kiselog detergent lignina (metoda prema Van Soest-u) te smanjenja udjela celuloze (metoda prema Wijkstrom-u) i hemiceluloze (razlika između NDF-a i ADF-a, metoda prema Van Soest-u). Nakon 30. dana biološke obrade, postignuta je 51,74 % - tna konverzija lignina. Kukuruzovina sadrži visok udio složenih ugljikohidrata, ali su oni slabo probavljivi. U ovom istraživanju je pokazano da se obradom kukuruzovine s *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima postiže bolja probavljivost materijala. Budući da je glavna prepreka složeni polimer lignin koji omeđuje celulozu i hemicelulozu te tvori čvrstu i kompaktnu strukturu, već nakon 10. dana provedbe fermentacije postignuta je 48,28 % - tna konverzija lignina, postignuto je potpuno oslobađanje hemiceluloze iz stanične stijenke kukuruzovine, znatno povećanje udjela celuloze, neutralnih detergent vlakana i kiselih detergent vlakana. Dobiveni rezultati potvrđuju navedenu pretpostavku o povećanju probavljivosti kukuruzovine nakon biološke obrade.

6. LITERATURA

- Abotsi E, Jansen van Rensburg EL, Howard S: Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production Howard. *Biotechnology*, 2(12):602-619, 2003.
- Abramson M, Shoseyov O, Shani Z: Plant cell wall reconstruction toward improved lignocellulosic production nad processability. *Plant Science*, 178:61–72, 2009.
- Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin DB: Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29:675-685, 2011.
- Akintokun AK, Adeyosoye OI, Abiola-Olagunju O, Joel EO: Identification and Occurrence of Heterophilic Rumen Bacteria and Fungi Isolated from Selected Nigerian Breeds of Cattle. *Environmental Microbiology*, 6:303-308, 2014.
- Antonović A: Kemija drva I. Šumarski fakultet, Zagreb, 2010.
- Antonović A: Kemija drva II. Šumarski fakultet, Zagreb, 2008.
- Benes I, Velić N, Planinić M, Šmogrovičova 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.
- Chen Hongzhang: Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice, Springer Netherlands, 2014.
- Chen Q, Marshall MN, Geib SM, Tien M, Richard TL: Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover. *Bioresource Technology*, 117:186-192, 2012.
- 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: Opća mikrobiologija. Zagreb, 1996.
- Galbe M, Zacchi G: Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, 46:70–78, 2012.
- Geng X, Henderson WA: Pretreatment of corn stover by combining ionic liquid dissolution with alkali extraction. *Biotechnology and Bioengineering*, 109:84-91, 2011.
- Golubović DĐ: Strukturna ispitivanja ćelijskog zida i lignina različitog porekla. Beograd, 2013.

-
- Grbeša D: Bc hibridi kukuruza u hranidbi životinja: Bc Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja d.d.. Zagreb, 2008.
- Hendriks ATWM, Zeeman G: Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100:10-18, 2009.
- Holtzaple MT, Kim S: Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*, 96:1994–2006, 2005.
- Hunt CW, Kezar W., Vinande R.: Yield, Chemical Composition, and Ruminai Fermentability of Corn Whole Plant, Ear, and Stover as Affected by Hybrid. *Production Agriculture*, 5:286-290, 1992.
- Isroi, Millati R, Syamsiah S, Niklasson C, Cahyanto MN, Lundquist K, Taherzadeh MJ: Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review *Bioresources*, 6:5224-5259, 2011.
- Janeš K: Rast *Trametes versicolor* u uvjetima submerznog uzgoja, *Diplomski rad*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.
- Janušić V, Ćurić D, Krička T, Voća N, Matin A: Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. Zagreb, 2008.
- Jović JM, Pejin JD, Kocić-Tanackov SD, Mojović LjV: Primena gljiva koje razgrađuju lignocelulozu za proizvodnju bioetanola iz obnovljive biomase. *Kemija u industriji*, 69(6):627-641, 2015.
- Kedong M, Zhiyong R: Production of a lignocellulolytic enzyme system for simultaneous bio-delignification and saccharification of corn stover employing co-culture of fungi. *Bioresource Technology* 175:586-593, 2015.
- Kerley MS, Fahey GC, Berger LL, Merchen NR, Gould JM: Effects of alkaline hydrogen peroxide treatment of wheat straw on site and extent of digestion in sheep, *Animal Science*, 63:868-878, 1986.
- Kima TH, Kimb JS, Sunwooc C, Leea YY: Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia, *Bioresource Technology*, 90:39-47, 2003.
- Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P: Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48:3713-3729, 2009.
-

- Lee JW, Gwak KS, Park JY, Park MJ, Choi DH, Kwon M, Choi IG: Biological Pretreatment of Softwood *Pinus densiflora* by Three White Rot Fungi. *Microbiology*, 45:485-491, 2007.
- Li Y, Park SY, Zhu J: Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15:821–826, 2011.
- Liew LN, Shi J, Li Y: Enhancing the solid-state anaerobic digestion of fallen leaves through simultaneous alkaline treatment. *Bioresource Technology*, 102:8828–8834, 2011.
- Liu C, Wyman CE: Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology*, 96:1978-1985, 2005.
- Liu L, Sun J, Cai C, Wang S, Pei H, Zhang J: Corn stover pretreatment by inorganic salts and its effects on hemicellulose and cellulose degradation. *Bioresource Technology*, 100: 5865–5871, 2009.
- Lopez MJ, Suarez-Estrella F, Vargas-Garcia MC, Lopez-Gonzalez JA, Verstichel S, Debeer L, Wierinck I, Moreno J: Bidelignification of agricultural and forest wastes: Effect on anaerobic digestion. *Biomass and bioenergy* 58:343-349, 2013.
- Ma K, Ruan Z: Production of a lignocellulolytic enzyme system for simultaneous biodelignification and saccharification of corn stover employing co-culture of fungi, *Environmental and Chemical Engineering*, 175:586–593, 2015.
- Mandebvu P, West JW, Hill GM, Gates RN, Hatfield RD, Mullinix BG, Parks AH, Caudle AB: Comparison of Tifton 85 and Coastal Bermudagrass for Yield, nutrient traits, intake, and digestion by growing beef steers. *Animal Science*, 77(6):1572-1586, 1999.
- Mitchell DA, Krieger N, Berovič M: Solid State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation, Springer-Verlag, Berlin 2006.
- Mlinerek T: Razvoj kinetičkog modela rasta *Trametes versicolor* na glukozu. *Diplomski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.
- Monlau F, Barakat A, Trably E, Dumas C, Steyer JP, Carrère H: Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. *Environmental Science and Technology*, 43:260-322, 2013.

-
- Öhgren K, Bura R, Saddler J, Zacchi G: Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology*, 98:2503-2510, 2007.
- Pandey A, Soccol CR, Larroche C: Current Developments in Solid-state Fermentation, 2008.
- Pordesimoa LO, Hamesb BR, Sokhansanjc S, Edensd WC: Variation in corn stover composition and energy content with crop maturity. *Biomass and Bioenergy*, 28:366-374, 2005.
- Pu Y, Hu F, Huang F, Davison BH, Ragauskas AJ: Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. *Biotechnology for Biofuels*, 6:1754-6834, 2013.
- Saha BC: Hemicellulose bioconversion. *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5):279-91, 2003.
- Sambusiti C, Ficara E, Rollini M, Manzoni M, Malpei F: Sodium hydroxide pretreatment of ensiled sorghum forage and wheat straw to increase methane production. *Water Science and Technology*, 66(11):2447-52, 2012.
- Sánchez OJ, Cardona CA: Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13):5270-95, 2007.
- Saritha M, Arora A: Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. *Microbiology*, 52(2):122-130, 2012.
- Sasmitaloka KS, Suryani A, Mangunwidjaja D: Microbial Delignification of Corn Stover by *Phanerochaete chrysosporium* in Solid State Fermentation. *Agro-Industrial Technology*, 8:2319-4219, 2016.
- Shen D, Xiao R, Gu S, Zhang H: The Overview of Thermal Decomposition of Cellulose in Lignocellulosic Biomass. *Science, Technology and Medicine*, 2013.
- Šelo G: Utjecaj dodatka sirka na aktivnost lakaze tijekom submerznog uzgoja *Trametes versicolor*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Themelis N J: Anaerobic digestion of biodegradable organics in municipal solid wastes, Columbia University, 2002.
- Van Kuijk SJA, Sonnenberg ASM, Baars JJP, Hendriks WH, Cone JW: Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient. A review, *Biotechnology Advances*, 2014.
-

- Wan C, Li Y: Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances* 30:1447-1457, 2012.
- Wood M: MykoWeb: Mushrooms & other Fungi on the Web, 2015.
http://www.mykoweb.com/CAF/photos/Trametes_versicolor%28nw-01%29.jpg,
[29.01.2015.]
- Xavier MRB, Tavares APM, Ferreira R, Amado F: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Biotechnology*, 10:0717-3458, 2007.