

# Biorazgradnja otpada porijeklom iz prehrambene i šumarske industrije u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

---

Čubel, Ivan

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:109:292824>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Ivan Čubel**

**Biorazgradnja otpada porijeklom iz prehrambene i šumarske  
industrije u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, veljača 2014.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Biotehnologija  
**Nastavni predmet:** Kemijski i biokemijski reaktori  
**Tema rada** je prihvaćena na IX. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 20. lipnja 2013.  
**Mentor:** dr. sc. *Marina Tišma*, doc.

### Biorazgradnja otpada porijeklom iz prehrambene i šumarske industrije u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

*Ivan Čubel*, 168 - DI

#### Sažetak:

Biološka razgradnja lignoceluloznog materijala pomoću različitih filamentoznih mikroorganizama katalizirana je lignolitičkim enzimima. Njihovo djelovanje se očituje u uklanjanju lignina koji omeđuje celulozu u materijalu te razbijanju aromatske strukture lignina cijepajući veze između osnovnih jedinica niže molekulske mase. U ovome radu istraživana je mogućnost upotrebe plijesni (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*) i gljiva bijelog truljenja (*Ceriporiopsis subvermispota*, *Dichomitus squalens* i *Phanerochaete chrysosporium*) u svrhu razgradnje repinih rezanaca i piljevina drveta bukve (*Fagus sylvatica*), hrasta kitnjaka (*Quercus petraea*) i cera (*Quercus cerris*) u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Analizirani su udjeli suhe tvari, ukupnog ugljika, ukupnog organskog i ukupnog anorganskog ugljika, te udio netopivog i topivog lignina na početku, tijekom i na kraju procesa fermentacije. Najveća konverzija u pogledu razgradnje lignina postignuta je s gljivom bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium* koristeći repine rezance ( $X = 82,68\%$ ). Zbog adsorpcije spora plijesni na supstrat i njihovog utjecaja na porast udjela ukupnog organskog ugljika postignuta je niska konverzija ukupnog organskog ugljika u svim uzorcima (do 9,72 %).

**Ključne riječi:** Biorazgradnja, repini rezanci, piljevine drveta, *C. subvermispota*, *D. squalens*, *P. chrysosporium*, *A. niger*, *A. ochraeus*

**Rad sadrži:** Slika: 18  
Stranica: 60  
Tablica : 18  
Literarnih referenci: 22

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:** 24. veljače 2014. god

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

**Datum obrane:** 24. veljače 2014.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Biotechnology  
**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. IX. held on June 20<sup>th</sup>, 2013.  
**Mentor:** *Marina Tišma, PhD, assistant prof.*

### Biodegradation of food and timber industry waste during solid – state fermentation

*Ivan Čubel, 168 - DI*

#### Summary:

Biodegradation of lignocellulosic materials by using different filamentous microorganisms is catalyzed by lignolytic enzymes. Their activity is manifested in the removal of lignin, which bounds cellulose in the material and in breaking of the aromatic structure of lignin by breaking bonds between basic units of lower molecular mass. The possibility of mold (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*) and white rot fungi (*Ceriporiopsis subvermispora*, *Dichomitus squalens* and *Phanerochaete chrysosporium*) usage in degradation of sugar beet pulp and beech (*Fagus sylvatica*), sessile oak (*Quercus petraea*) and oak (*Quercus cerris*) sawdust by solid state fermentation, is discussed in this paper. The shares of dry matter, total carbon, total organic and total inorganic carbon and share of insoluble and soluble lignin at the beginning, during and at the end of the fermentation process, were analysed. The highest conversion in terms of lignin degradation was achieved with white rot fungus *P. chrysosporium* by using sugar beet pulp (X = 82.68 %). Due to the adsorption of mold spores in the substrate and their impact on the growth of total organic carbon share, low conversion of total organic carbon in all samples was achieved (up = 9.72 %).

**Key words:** Biodegradation, sugar beet pulp, beech, *C. subvermispora*, *D. squalens*, *P. chrysosporium*, *A. niger*, *A. ochraeus*

**Thesis contains:** Figures: 18  
Pages: 60  
Tables: 18  
References: 22

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

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

**Defense date:** February 24, 2014.

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

*Svakako bih se na samom početku htio zahvaliti mentorici dr. sc. Marini Tišmi, doc. koja mi je pružila veliku čast omogućivši izradu ovoga diplomskog rada pod svojim vodstvom. Veliko Vam hvala na posvećenom vremenu i znanju. Vaš profesionalni odnos prema ljudima i studentima s kojima surađujete uvijek će mi poslužiti kao primjer izvrsnosti u životu.*

*Hvala i ostalim djelatnicima Prehrambeno – tehnološkoga fakulteta; prvenstveno dr. sc.. Nataliji Velić, doc. i dr. sc. Mireli Planinić, doc.; te gospođi Jelki Babić na potpori i korisnim savjetima tijekom brojnih sati provedenih u laboratoriju.*

*Također, veliko hvala cijeloj ekipi Brodarskog instituta na izvrsnom gostoprimstvu i stručnim savjetima koje su mi pružili tijekom moga boravka u Zagrebu.*

*Veliko hvala i kolegici Ivani Jozić koja me je poticala i bila mi potpora tijekom cijeloga studiranja.*

*Dragi moji prijatelji i kolege sa smjera Procesno inženjerstvo, Vama neizmjereno hvala na potpori tijekom ovih teških i dobrih situacija kroz meni najljepši period u životu.*

*Na samom kraju, jedna neizmjereno velika zahvala mojim roditeljima, te bratu i sestri na podrškama, razumijevanju i pomoći tijekom studiranja, bez kojih ne bih mogao završiti ovo poglavlje svoga života.*

*Hvala Vam svima od srca!*

## Sadržaj:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Lignocelulozni materijali .....	4
2.1.1. Šećerna repa ( <i>Beta vulgaris</i> ) .....	4
2.1.2. Drvni materijal.....	5
2.2. Kemijski sastav lignoceluloze.....	6
2.2.1. Lignin .....	6
2.2.2. Celuloza.....	7
2.2.3. Hemiceluloza.....	7
2.3. Mikroorganizmi za razgradnju lignocelulozne biomase .....	8
2.3.1. <i>Aspergillus niger</i> .....	8
2.3.2. <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	9
2.3.3. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	9
2.3.4. <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> .....	10
2.3.5. <i>Dichomitus squalens</i> .....	10
2.4. Procesi prerade lignocelulozne biomase .....	11
2.4.1. Termokemijska tehnologija.....	12
2.4.2. Biokemijska tehnologija .....	12
2.5. Fermentacija na čvrstim nosačima .....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	15
3.1. Zadatak.....	16
3.2. Materijali i metode .....	16
3.2.1. Supstrat.....	16
3.2.2. Mikroorganizmi .....	16
3.2.3. Priprema hranjive podloge.....	17

3.2.4.	Uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima .....	17
3.2.5.	Ekstrakcija akcesornih tvari.....	18
3.2.6.	Određivanje udjela suhe tvari .....	18
3.2.7.	Određivanje udjela organskog ugljika (TC) .....	19
3.2.8.	Određivanje udjela anorganskog ugljika (IC) .....	19
3.2.9.	Određivanje udjela ukupnog organskog ugljika (TOC) .....	20
3.2.10.	Određivanje udjela lignina.....	20
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	22
4.1.	Razgradnja repinih rezanaca.....	23
4.1.1.	Razgradnja repinih rezanaca pomoću plijesni .....	23
4.1.2.	Razgradnja repinih rezanaca pomoću gljiva bijelog truljenja .....	27
4.2.	Razgradnja piljevine drveta bukve .....	32
4.2.1.	Razgradnja piljevine bukve pomoću plijesni.....	32
4.2.2.	Razgradnja piljevine bukve pomoću gljive bijelog truljenja .....	35
4.3.	Razgradnja piljevine drveta cera .....	37
4.3.1.	Razgradnja piljevine cera pomoću plijesni .....	37
4.3.2.	Razgradnja piljevine cera pomoću gljive bijelog truljenja .....	40
4.4.	Razgradnja piljevine drveta hrasta kitnjaka.....	42
4.4.1.	Razgradnja piljevine hrasta kitnjaka pomoću plijesni .....	42
4.4.2.	Razgradnja piljevine drveta hrasta kitnjaka pomoću gljive bijelog truljenja.....	45
5.	ZAKLJUČCI .....	47
6.	LITERATURA .....	50

## Popis oznaka, kratica i simbola

TC	Ukupni ugljik
IC	Anorganski ugljik
TOC	Ukupni organski ugljik
SSF	Fermentacija na čvrstim nosačima



## **1. UVOD**

Negativne klimatske i ekološke promjene, poput emisije stakleničkih plinova i globalnog zatopljenja, te porast cijene nafte na svjetskom tržištu sve više potiču upotrebu obnovljivih izvora energije, poput biogoriva. Poljoprivredne kulture koje se koriste za proizvodnju biogoriva su kukuruz, šećerna trska, pšenica, krumpir, šećerna repa, uljana repica, suncokret, soja, palma i dr. Međutim, proizvodnja biogoriva iz poljoprivrednih kultura, mogla bi iscrpiti velika proizvodna područja hrane i prirodna staništa, te podići cijenu hrane na svjetskom tržištu, a za posljedicu imati samo neznatno smanjenje emisije stakleničkih plinova, uz istovremenu moguću nestašicu hrane na Zemlji (Rozman i sur., 2004.). Zbog toga se sve više istražuju mogućnosti iskorištavanja lignoceluloznog otpada (poljoprivrednog i šumarskog otpada, te otpada iz prehrambene industrije) u svrhu proizvodnje biogoriva. Lignocelulozni otpad može se naći i u kućanstvima (komunalni otpad). Općenito se komunalni otpad može klasificirati u dvije osnovne skupine: otpad biljnog porijekla i otpad animalnog porijekla. Poljoprivredni otpad biljnog porijekla je otpad koji se uglavnom sastoji od polisaharida (celuloze i hemiceluloze), lignina i ekstraktivnih tvari koje sadrže ugljik, vodik i kisik. Elementi u tragovima poput dušika, sumpora, klora i metala su također prisutni u biomasama poljoprivrednog otpada ove skupine. Pored toga, poljoprivredni otpad biljnog porijekla može biti klasificiran u slijedeće skupine: otpad drvenastih biljaka i otpad zeljastih biljaka. Drvenaste biljke sačinjene su od čvrsto vezanih vlakana što karakterizira ovu skupinu sporim rastom, dok zeljaste biljke sačinjavaju slabo vezana vlakna što ih karakterizira bržim rastom. Brzorastuće vrste drveća, kao što su topola i vrba, sade se na tzv. kratkorotacijskim plantažama, a žanju se već nakon nekoliko godina. Trska je potencijalno vrlo važna energijska sirovina koja zahtijeva tlo vrlo visoke kakvoće i dobru opskrbljenost vodom. Pogodni za proizvodnju energetskih oblika su i slama, ali i specijalne žitarice, npr. tritikale, hibrid pšenice i raži (Tsai et al, 2004.).

Lignocelulozni materijal se biološkom metodom, upotrebom različitih filamentoznih mikroorganizama, može razgraditi do jednostavnijih spojeva djelovanjem lignolitičkih enzima (mangan i lignin peroksidaze te oksidaza lakaza). 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. Lignin-peroksidaza kao supstrat koristi veratrilni alkohol, dok mangan-peroksidaza koristi organske kiseline i

nezasićene masne kiseline, a katalizira oksidaciju fenolnih spojeva i  $Mn^{2+}$  u  $Mn^{3+}$ . Lakaze kataliziraju oksidaciju različitih mono - i difenolnih spojeva.

Upotreba filamentoznih mikroorganizama (plijesni i gljiva bijelog truljenja) u svrhu razgradnje različitog lignoceluloznog otpada poznata je u znanstvenim istraživanjima, no njihova upotreba danas još nije komercijalizirana. Važnost razgradnje ovog materijala je ponajprije zbog njihove daljnje mogućnosti upotrebe u procesima proizvodnje biogoriva. Na tržištu se uglavnom koriste kemijski procesi obrade lignoceluloznog materijala koji su skupi (zbog cijene kemikalija) i ekološki neprihvatljivi (zbog upotrebe agresivnih i po okoliš opasnih kemikalija). Nedostatak procesa, u kojima se kao materijal za biološku razgradnju upotrebljavaju čvrsti i polučvrsti lignocelulozni supstrati, je heterogenost sustava što stvara velike poteškoće tijekom procesa miješanja u bioreaktoru, a kao posljedicu ima otežan prijenos tvari i topline.

U ovome radu korišten je različiti lignocelulozni materijal kao supstrat za uzgoj različitih filamentoznih mikroorganizama, a to su repini rezanci dobiveni nakon procesa proizvodnje konzumnog šećera, zatim piljevina drveta bukve (*Fagus sylvatica*), hrasta kitnjaka (*Quercus petraea*), i cera (*Quercus cerris*). Mikroorganizmi su uzgajani u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u laboratorijskim tikvicama.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Lignocelulozni materijali

Osnovni sastojci lignocelulozne biomase su celuloza, hemiceluloza i lignin. Najveći izazov za potpuno ostvarenje potencijala lignocelulozних materijala kao supstrata za proizvodnju vrijednih biotehnoških produkata je svladati njihovu veliku otpornost prema razgradnji do jednostavnih šećera. Lignocelulozni materijali nakupljaju se svake godine u velikim količinama iz šumarstva, poljoprivrede, i poljoprivredno industrijskog otpada. Jeftin su i obnovljiv izvor energije. Takav otpad uključuje razne materijale kao što su piljevina, topola, šećerna trska, otpadni papir, pivski trop, trave i slame, stabljike, lišće, ljuske, žitarice kao što su riža, pšenica, kukuruz, sirak ječam i drugo (Mussatto i Teixeira, 2006.). Kao prirodni proizvod biološkog porijekla, lignocelulozna biomasa je karakterizirana visokim stupnjem raznovrsnosti u njihovim svojstvima te je dostupna u različitim oblicima. Drvo, kao predstavnik lignocelulozne biomase karakterizirano je velikom čvrstoćom, lako se prerađuje s niskom potrošnjom energije. Nadalje, uz drvo, ostali lignocelulozni vlaknasti materijali su također izolatori topline i elektriciteta, pokazuju malu termalnu kontrakciju i ekspanziju i imaju dobra akustična svojstva. Omjer između čvrstoće i težine je vrlo visok za lignocelulozna vlakna kada ih usporedimo s gotovo bilo kojim vlaknom. (Antolović, 2008.).

### 2.1.1. Šećerna repa (*Beta vulgaris*)

Šećerna repa (*Beta vulgaris*) pripada porodici Chenopodiaceae koja obuhvaća oko 1400 vrsta. Dvogodišnja je biljka koja se uglavnom uzgaja u umjereno hladnim podnebljima. Vrlo je važna sirovina za proces proizvodnje konzumnog šećera jer se najveći dio šećera nalazi u korijenu, koji je ujedno tehnološki najznačajniji dio šećerne repe.

Tehnološki postupak proizvodnje šećera uglavnom je kontinuirani postupak koji se sastoji od nekoliko proizvodnih faza povezanih u cjelinu. Proizvodnja šećera iz šećerne repe započinje prijemom same sirovine u tvornicu. Zatim slijedi analiza sirovine te ocjena kvalitete, nakon čega sirovina odlazi na čišćenje, pranje i rezanje u rezance. Tako izrezana sirovina odlazi na difuziju. Difuzijom se dobije difuzni sok koji odlazi na ekstrakciju ili izluživanje. Tim postupkom se ujedno dobiju i izluženi repini rezanci, koji se potom prešaju i/ili suše (Babić, 2009.).

Repini rezanci su nusproizvod industrije šećera, a sastoji se od biljnih vlakna dobivenih nakon ekstrakcije saharoze. U prosjeku oko 63,5 kg repinih rezanaca je proizvedeno je od jedne tone šećerne repe. Koriste se kao hrana za životinje, ali zbog niskog sadržaja lignina potencijalna su sirovina za proizvodnju bioetanol. U **Tablici 1** prikazan je prosječan kemijski sastav šećerne repe (Babić, 2009.).

**Tablica 1** Prosječan kemijski sastav šećerne repe (g/100 g repe) (Babić, 2009.)

Sastojak		Udio (%)
Saharoza		14 – 20
Tvari netopljive u vodi	Celuloza	0,9 – 1,2
	Hemiceluloza	1,1 – 1,5
	Pektini	0,9 – 2,4
	Lignin	0,1 – 0,3
	Pepeo	cca. 0,1
Dušični spojevi		1,0 – 1,2
Anorganski sastojci		0,4 – 0,5

### 2.1.2. Drvni materijal

Stablo je živa i dugotrajna biljka, koja pripada u grupu biljaka koje se nazivaju sjemenjače (*Spermatophytae*), koje se dalje dijele na golosjemenjače (*Gymnospermae*) i kritosjemenjače (*Angyospermae*). Osnovni strukturni dijelovi stabla uključuju deblo, krošnju, grane, korijenje, koru i lišće. Od ovih dijelova stabla, za njegovu komercijalnu upotrebu najvažniji je otkorano deblo. Općenito, drvo je nejednolik (anizotropan) materijal, s obzirom na njegova atomska, fizička i mehanička svojstva. Drvo je izgrađeno od različitih vrsta stanica, koje daju mehaničku potporu, sudjeluju u transportu vode (otprilike polovicu mase čitavog stabla čini voda) i izmjeni tvari. Vrste stanica drva, njihov postotak i raspored međusobno se razlikuju između različitih vrsta stabala. Drvne stanice su kemijski heterogene i tvore

polimernu mrežu strukturnih komponenata: ugljikohidrate (celuloza i hemiceluloza) i lignin. Ove makromolekularne tvari nisu jednoliko raspoređene unutar stanične stijenke drva, te njihova relativna koncentracija varira između različitih dijelova stabla. Nestrukturne komponente (ekstraktivne tvari, neke organske tvari topljive u vodi i anorganske tvari), predstavljaju samo malu frakciju te su uglavnom sastavljene od niskomolekularnih komponenata većinski smještenih izvan stanične stijenke. Nadalje, količina sastojaka koji sadrže dušik, kao što su proteini i alkaloidi prisutni su u staničnoj stijenci drveta (Antolović, 2008.).

**Tablica 2** Prosječan kemijski sastav drveta (Antolović, 2008.)

Vrsta drveta	Udio ugljika (%)	Udio vodika (%)	Udio kisika (%)
Bukovina	48,5	6,3	45,2
Hrastovina	49,4	6,1	44,5

## 2.2. Kemijski sastav lignoceluloze

### 2.2.1. Lignin

Pored celuloze, lignin je najzastupljenija polimerna organska tvar u biljkama. Struktura mu je za razliku od celuloze, kompleksna, nepravilna i trodimenzionalna. Lignin štiti drvo od bolesti i truljenja uzrokovanog mikroorganizmima. Lignin formira amorfan kompleks zajedno s hemicelulozom enkapsulirajući celulozu. Budući da lignin predstavlja tvar teško dostupnu napadima mikroorganizama, djeluje kao učvršćujuća komponenta koja povezuje stanice i štiti unutrašnju stranu staničnog zida drva. Uzrok velike otpornosti lignina leži u aromatskim prstenovima koji su teže razgradivi (Schmidt, 2006.).

Lignin je otporan na većinu mikroorganizama. Gljive bijelog truljenja su među rijetkim mikroorganizmima koji imaju sposobnost razgradnje lignina. Ukoliko se lignocelulozni materijali upotrebljavaju u anaerobnim fermentacijama u procesima proizvodnje bioplina,

lignin se ne može razgraditi u metanogenoj fazi te ga je potrebno prethodno ukloniti. U tehnologiji prerade drveta lignin se definira kao dio drvne mase netopljiv u razrijeđenim kiselinama i organskim otapalima. Može se kvalitativno dokazati reakcijom s otopinom anilin hidroklorida pri čemu nastaje žuto obojenje. Razgradni produkti lignina služe u manjoj mjeri za sintezu ionsko izmjenjivačkih smola te kao komponente lakova i sintetskih smola, dok procesom bazno – katalizirane depolimerizacije lignina moguće je proizvesti aditive za goriva ali su takva istraživanja još u eksperimentalnoj fazi (Andričić, 2009.).

### 2.2.2. Celuloza

Celuloza je polisaharid koji se sastoji od niza glukoernih jedinica povezanih  $\beta$  1, 4 – glikozidnom vezom. Sastoji se od dugačkih paralelnih lanaca povezanih vodikovim vezama, posljedica kojih je kristalična struktura celuloze. Skupine celuloernih lanaca nazivaju se fibrili. Kemijska otpornost celuloze uzrokovana njezinom fibrinalnom strukturom. Potpunom hidrolizom celuloze nastaje D – glukoza, a taj proces je od velikog interesa u proizvodnji bioetanolu i stočne hrane (Andričić, 2009.).

### 2.2.3. Hemiceluloza

Uz celulozu, u drvetu kao i u ostalim biljnim tkivima je prisutan veliki broj različitih polisaharida koji se nazivaju polioze ili hemiceluloze, a nazivaju se još i nisko molekularne celuloze. Sadržaj hemiceluloza se kreće između 20 – 35 % od ukupne mase drva, a uglavnom se nalaze u primarnim i sekundarnim staničnim stjenkama, te se nalaze u izrazito malim količinama i u središnjoj lameli stanica drva (Vidaković, 2012.).

Danas je poznato da hemiceluloza pripada grupi heterogenih polisaharida koji se stvaraju kroz biosintetske puteve različite nego kod celuloze. Drvne polioze se razlikuju od celuloze po sastavu različitih šećera i po granjanju lanaca molekula. Jedinice šećera koje tvore polioze mogu se podijeliti na grupe kao što su pentoze, heksoze, heksouronske kiseline i deoksiheksoze.



## 2.3. Mikroorganizmi za razgradnju lignocelulozne biomase

Mikroorganizmi (grč. *mikros* – malen; *organismos* – organizam) su organizmi koji su mikroskopski, najčešće premali da bi se vidjeli golim okom. Nevjerovatno su raznoliki i uključuju gljive, bakterije i protiste, ali i neke mikroskopske biljke i životinje kao što su plankton ili praživotinje poput amebe (Pilaš, 2009.). Osnovno svojstvo mikroorganizama je mala veličina njihovih stanica. Ona nije bila samo osnova za odvajanje mikroorganizama od životinja i biljaka, nego je imala i značajne posljedice što se tiče morfologije, aktivnosti, prilagodljivosti, raširenosti i metaboličkih procesa koji se u mikroorganizmu odvijaju (Franjo, 2009.).

Sa stajališta bioloških znanosti, klasifikacija je uređen poredak organizama sa sličnim fiziološkim osobinama ili biokemijskim i genetičkim značajkama unutar pojedinih skupina. Danas je prihvaćena klasifikacija koja se temelji na sastavu tri domene.

**Gljive** su heterotrofni organizmi koji sadrže polisaharid hitin u staničnoj stijenci. Gljive mogu biti jednostanični mikroorganizmi, npr. kvasci; višestanični mikroorganizmi, npr. plijesni i makroskopske ili više gljive.

**Plijesni** rastu kao stanične tvorevine u obliku nitastih isprepletenih filamenata, hifa koje tvore micelij.

**Kvasci** su jednostanične gljive i razmnožavaju se nespolno stvaranjem pupa, ili spolno tvorbom spora. Njihove su stanice veće od bakterijskih i posjeduju većinu eukariotskih organela (Franjo, 2009.).

### 2.3.1. *Aspergillus niger*

Plijesni roda *Aspergillus* imaju sposobnost rasta u različitim klimatskim uvjetima i ubrajaju se u najvažnije plijesni koji uzrokuju kvarenje namirnica i stvaranje mikotoksina. Rast plijesni ovisi o raznim čimbenicima, kao što su pH, aktivitet vode, koncentracija otopine, temperatura i atmosferski uvjeti (Gracia i sur., 2011.).

Spore plijesni *Aspergillus* su često sastavni dio zraka i putuju zračnim strujama, da bi se u dodiru s čvrstom ili tekućom podlogom pričvrstile te dolazi do razmnožavanja pri odgovarajućim uvjetima vlažnosti (Komar, 2012.).

*Aspergillus niger* je plijesan iz roda *Aspergillus* koja se upotrebljava u proizvodnji limunske kiseline i enzima poput amilaza, proteaza i lipaza (May i Adams, 1997.), a može se koristiti u području gospodarenja otpadom i u biotransformacijama. Nalazi se najčešće u mezofilnim sredinama poput propadajuće vegetacije tla i biljaka (Schuster et al, 2002.).

*A. niger* proizvode kolonije koje se sastoje od bijelog ili žutog osjetila koje je pokriveno tamnim sporama. Metabolički sustav sastoji se od citoplazme, mitohondrija i periksoma (May i Adams, 1997.).

### **2.3.2. *Aspergillus ochraceus***

*Aspergillus ochraceus* je plijesan koja pripada rodu *Aspergillus* poznata po proizvodnji mikotoksina okratoksina A. *Aspergillus ochraceus* može obezbojiti različite ksenobiotičke boje. Biorazgradnja boja je dokazana njihovim obezbojenjem na hranjivoj podlozi (Mäkelä et al. 2009).

*A. ochraceus* se u industriji primjenjuje za proizvodnju ksilanaze i  $\beta$  – ksilozidaze.

### **2.3.3. *Phanerochaete chrysosporium***

*Phanerochaete chrysosporium* je gljiva bijelog truljenja koja je proučavana kao modelni organizam u razjašnjavanju metaboličkih puteva koji omogućuju razgradnju lignina. Ti isti mehanizmi su uključeni u mineralizaciju za okoliš toksičnih fenolnih kemikalija. Zbog ovih razloga *P. chrysosporium* se koristi u brojnim bioprocima čija je uloga zaštita okoliša, kao primjerice biorazgradnja teško razgradivog lignina u poljoprivrednom otpadu s ciljem njegove daljnje upotrebe za ishranu stoke ili za proizvodnju bioetanola (nastaje sirovina s visokim udjelom fermentabilnih šećera), procesi izbjeljivanja u industriji papira i tkanine, detoksikacija i dekolorizacija industrijskih otpadnih voda ili bioremedijacija odlagališta opasnog otpada (Fraser, 2005.).

### 2.3.4. *Ceriporiopsis subvermispora*

*Ceriporiopsis subvermispora* je gljiva bijelog truljenja koja pripada podrazdjelu Basidiomycota koje selektivno razgrađuju lignin rastući na drvetu. Dokazano je da *C. subvermispora* i u ranim fazama raspada drveta značajno depolimerizira lignin, iako je taj gubitak lignina jako mali (Tanaka, 2009).

*C. subvermispora* tijekom biorazgradnje drveta proizvodi oksidativne enzime. Mangan ovisna peroksidaza (MnP) je najzastupljeniji enzim, a zatim slijedi lakaza. Samo spojevi s niskom molekularnom masom mogu difundirati kroz staničnu stjenku drveta tijekom ranih faza razgradnje gljivama bijelog truljenja. Gljive koje razgrađuju drvo proizvode različite spojeve niske molekularne mase koje izlučuje micelij ili su nastali razgradnjom/biotransformacijom nekih komponenti drveta. Primjećeno je da *C. subvermispora* izlučuje nekoliko niskomolekularnih spojeva uključujući oksalnu i glioksalnu kiselinu u izvanstaničnu tekućinu (Jurić T., 2012.).

### 2.3.5. *Dichomitus squalens*

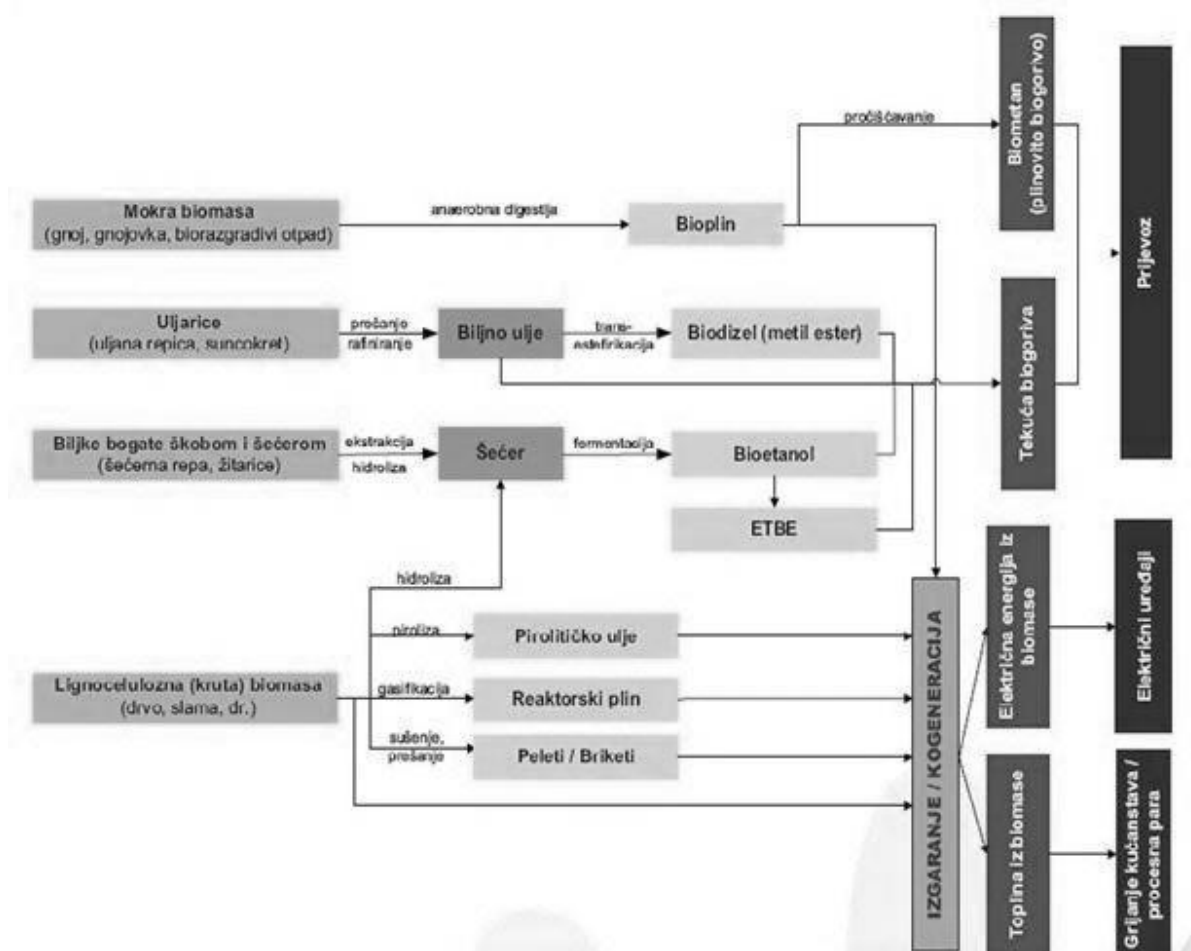
*Dichomitus squalens* je gljiva bijelog truljenja koja se upotrebljava u procesima obezbojenja bojila i pokazano je da je u tom pogledu učinkovitija od najistraživanije *P. chrysosporium* (Chander i Aurora, 2007).

*D. squalens* proizvodi MnP i lakazu, ali ne i LiP (Babič and Pavko, 2012.). Kod *P. chrysosporium* je primjerice razgradnja lignina funkcija djelovanja sekundarnog metabolizma u uvjetima bez prisustva izvora C ili N, međutim, *D. squalens* razgrađuje lignin i proizvodi MnP u uvjetima gdje u podlozi ima dovoljne koncentracije dušik, ali samo u prisutnosti  $Mn^{2+}$  iona (Vijay Bhasker Reddy et al., 2007).

*D. squalens* primjerice tijekom rasta na drvetu izlučuje oksalnu kiselinu i pokazano je da kad se u mediju nalaze visoke koncentracije oksalne kiseline, *D. squalens* proizvodi oksalat – dekarboksilazu. Općenito, sinteza oksalne kiseline kod gljiva se događa u mitohodrijima tijekom TCA ciklusa ili u gliksomima tijekom gliksalatnog ciklusa (Mäkelä et al. 2009).

## 2.4. Procesi prerade lignocelulozne biomase

Proces proizvodnje visokovrijednih proizvoda, kao obnovljivih izvora energije, iz poljoprivrednog otpada može se podijeliti na dva osnovna procesa: termokemijski i biokemijski proces. Termokemijska tehnologija iskorištavanja poljoprivrednog otpada uglavnom se temelji na obradi otpada za dobivanje plinovitih, tekućih i krutih energenata, dok za razliku od nje biotehnologija je bazirana na dobivanju tekućih goriva iz otpada (Tsai et al., 2004.).



**Slika 1** Shematski prikaz mogućnosti iskorištavanja lignocelulozne biomase

(<http://www.abcde-posavina.org> [03.09.2013.]

### 2.4.1. Termokemijska tehnologija

Poljoprivredni otpad biljnog porijekla zbog svoje visoke energetske vrijednosti predstavlja potencijalno važnu sirovinu za proizvodnju visokoenergetskih proizvoda u obliku zapaljivih plinova, katrana u obliku tekućeg goriva, krutih goriva i električne energije koji se dobivaju termokemijskim postupcima. Proces termokemijske pretvorbe biomase općenito podrazumijeva tri osnovne faze: izravno izgaranje, rasplinjavanje i pirolizu.

**Izravno izgaranje** je proces koji se temelji na oksidaciji ili direktnom sagorijevanju organske tvari u prisutnosti dovoljne količine kisika pri čemu se oslobađa određena količina topline. Ovakav način obrade otpadnog materijala je od vrlo velikog značaja, jer se ovom tehnologijom dobije toplina i/ili električna energija koja može recirkulirati u pogonu (Tsai et al., 2004.).

**Rasplinjavanje** se provodi na vrlo visokim temperaturama (i do 1400°C) uz ograničen dotok kisika, čime se povećava efikasnost proizvodnje električne energije u plinskoj turbini oko 35 % (moguće i do 45 %), u parnom kotlu na drva i oko 20 %. Glavni problem kod rasplinjavanja su plinske turbine koje su vrlo osjetljive na nečistoće u plinu (čestice, para) pa je iz toga razloga potrebno pročišćavanje što zahtijeva dodatne troškove (Šljivac i Šimić, 2009.).

**Proces pirolize** utemeljen je na termičkoj razgradnji organske tvari u otpadu bez prisutnosti kisika, pri čemu dolazi do isparavanja hlapljivih sastojaka i proizvodnje tekućeg goriva (bio – ulja). Ovaj proces je složen zbog vrlo promjenjivih svojstava bio – ulja ovisno o uvjetima i sirovini (Šljivac i Šimić, 2009.). Produkti pirolize su uglavnom biogoriva i bioplinovi (Tsai et al., 2004.).

### 2.4.2. Biokemijska tehnologija

Biokemijski procesi se temelje na biološkoj aktivnosti, gdje se tekuća ili kruta biomasa pretvara u tekuća goriva ili bioplin. Ovakvi procesi podijeljeni su na dva osnovna procesa: anaerobnu digestiju i alkoholnu fermentaciju (Al Seadi et al. 2008.).

**Anaerobna digestija (AD)** je biokemijski proces u kojem se kompleksni organski spojevi razgrađuju djelovanjem različitih vrsta bakterija u anaerobnim uvjetima (bez prisustva kisika). Anaerobna razgradnja prirodan je proces koji se svakodnevno događa u prirodi npr. u morskom sedimentu, u probavi preživača ili prilikom nastanka treseta (Al Seadi et al. 2008.). Anaerobnom digestijom nastaju metan, ugljični dioksid, nešto vodika i ostalih plinova u tragovima, manja količina topline te kao konačni proizvod gnojivo s većom količinom dušika. Takvo gnojivo sadrži dušik u mineraliziranom obliku (amonijak) koje biljke mogu brže apsorbirati nego organski dušik što ga čini posebno pogodnim za oplemenjivanje obradivih površina. Anaerobna digestija se odvija samo u specifičnim uvjetima među kojima su pH vrijednost od 6 do 7, temperatura od 25 do 37°C, te određeno vrijeme zadržavanja mješavine u digestatu (Šljivac i Šimić, 2009.). Za proces anaerobne digestije koristi se homogena mješavina dvaju ili više različitih supstrata, kao na primjer gnojnice i organski otpad iz prehrambene industrije (Al Seadi et al. 2008.).

**Alkoholna fermentacija** je metabolički proces u kojem djelovanjem mikroorganizma bez prisustva kisika dolazi do razgradnje ugljikohidrata, kao što su škrob ili šećer, u alkohol ili kiseline (Tsai et al., 2004.).

## 2.5. Fermentacija na čvrstim nosačima

Mikrobni procesi razgradnje organskih tvari mogu se odvijati submerzno, u tekućoj podlozi (eng. *Submerged fermentation*, SmF) i na čvrstoj podlozi (eng. *Solid state fermentation*, SSF). Glavna razlika između SmF i SSF je u količini slobodne vode u supstratu (Mitchell i Berovic, 2006.).

Fermentacija na čvrstim nosačima (SSF) zbog svojih prednosti u odnosu na SmF zauzima vodeću ulogu u tehnologiji za proizvodnju mikrobioloških proizvoda poput goriva, hrane, industrijskih kemikalija i farmaceutskih proizvoda.

Postoji nekoliko važnih aspekata, koje bi trebalo uzeti u obzir pri razvoju bioloških procesa primjenom fermentacije na čvrstim nosačima. To uključuje pravilan odabir podloge, odabir

radnog mikroorganizma, optimiranje procesnih parametara i odabir metode izolacije proizvoda.

Mikrobni procesi u reaktorima sa čvrstim slojem su procesi koji se zapravo svakodnevno događaju u našem okolišu, npr. na kruhu ili na trulom voću. To su procesi heterogenih interakcija mikroorganizma i vlažnog krutog supstrata pri čemu mikroorganizam može rasti između dijelova supstrata, unutar matriksa supstrata ili na površini supstrata. Mikrobna biomasa unutar matriksa supstrata ili na površini supstrata troši supstrat i izlučuje metabolite i enzime. Kako u krutoj tvari nema konvektivnog prijenosa tvari, potreban je koncentracijski gradijent za opskrbu supstratom i izdvajanje produkta.

Mikroorganizmi koji se koriste u SSF proizvode enzime koji razgrađuju polimere do manjih, lakše probavljivih spojeva. Isto tako, ti mikroorganizmi koriste spojeve nastale razgradnjom kao izvor C i N, pri čemu kao produkti metabolizma nastaju korisni produkti, primjerice enzimi.

Većina supstrata koji se upotrebljavaju u SSF su poljoprivrednog porijekla. Mogu se podijeliti u tri glavne grupe, obzirom na izvor ugljika:

- Škrobni supstrati: pšenica, ječam, kukuruz, riža...
- Celulozni ili lignocelulozni supstrati: klasovi kukuruza, pšenice, ječma, drvo...
- Supstrati koji sadrže topljive šećere kao glavni izvor ugljika: komina grejpa, slatki sorgum, šećerna repa, otpad od ananasa (Mitchell i Berovic, 2006.)

Unatoč brojnim prednostima, tijekom prošla dva desetljeća SSF je smatrana zaostalom tehnologijom u odnosu na submerznu fermentaciju, ponajviše zbog inženjerskih problema povezanih s prijenosom tvari i topline kao posljedica heterogenosti sustava, te poteškoćama pri uvećanju mjerila (*scale-up* procesa) (Xiong, 2004).

Neminovno je da u SSF, jednako kao i u SmF, postoji koncentracijski gradijent unutar čestica supstrata i biofilma mikroorganizma. Ovaj gradijent je potreban za transport supstrata i produkata. Na brzinu reakcije u SSF utječe: difuzija supstrata, metabolita i enzima. Ono što dodatno komplicira stvar je složenost fiziologije plijesni i njihova mogućnost kretanja, te činjenica da su SSF šaržni procesi (Rahardjo i Y.S.P, 2005.).

### **3.EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. ZADATAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je istražiti mogućnost upotrebe različitih mikroorganizama u svrhu razgradnje različitog lignoceluloznog otpada u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. U svrhu istraživanja razgradnje repinih rezanaca, korišteno je pet vrsta mikroorganizama (*Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispota* i *Dichomitus squalens*), dok su u svrhu istraživanja razgradnje različitih piljevina drveta (piljevina bukve, hrasta i cera) korištene *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* i *Phanerochaete chrysosporium*.

Tijekom uzgoja mikroorganizama na različitim supstratima, mjerene su koncentracija suhe tvari, udio lignina, te ukupnog organskog ugljika (TOC), anorganskog ugljika (IC) i ukupnog ugljika (TC).

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. Supstrat

Kao supstrat korišteni su repini rezanci iz šećerne industrije „Sladorana Županja d. d.“ (Županja, Hrvatska), te piljevine drveta bukve, cera i kitnjaka iz „Hrvatskih šuma“ (Hrvatske šume, Hrvatska).

#### 3.2.2. Mikroorganizmi

Kao mikroorganizmi za fermentaciju uzoraka korišteni su *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispota* CBS 347.63 i *Dichomitus squalens* CCBAS Reid 750. Kulture su uzgajane sedam dana na krumpirovom agaru (PDA) (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italy) pri 27°C.

### 3.2.3. Priprema hranjive podloge

Izvagano je 42 g krumpirovog agara (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italy) i dodano je 1000 mL destilirane vode, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu pri 121°C tijekom 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 su potom nacijepljeni mikroorganizmi. Inkubacija je trajala sedam dana pri 27°C.

### 3.2.4. Uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Provedeni su slijedeći eksperimenti:

- Uzgoj *A. ochraceus*, *A. niger*, *C. Subvermispora*, *D. squalens* i *P. chrysosporium* u laboratorijskim staklenkama koristeći repine rezance kao supstrat
- Uzgoj *A. ochraceus*, *A. niger* i *P. chrysosporium* u laboratorijskim staklenkama koristeći piljevine drveta kao supstrat

#### Provedba eksperimenta u laboratorijskim staklenkama

Izvagano je 50 g uzorka supstrata, te dodano 32 mL destilirane vode. Tako pripremljene kompleksne hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama sterilizirane su u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd), te je dodano pet micelijskih diskova (pomoću sterilnog bušača čepova  $\varnothing$  6 mm, sterilnom špatulom su diskovi prebačeni u laboratorijsku staklenku) kulture plijesni uzgojene na PDA agaru, te protrešen. Poklopac svake staklenke je zamijenjen s listom papirnato ručnika kako bi bili osigurani aerobni uvjeti. Označene laboratorijske staklenke s uzorcima stavljene su na inkubaciju u tresilicu koja je podešena na strujanje zraka temperature 25°C bez opcije trešenja. Staklenke s uzorcima protresane su ručno jednom dnevno kroz pet minuta. Inkubacija je trajala 10, 20, 30 i 45 dana za uzorke repinih rezanaca, te 10 i 45 dana za uzorke piljevina.



**Slika 2** Biorazgradnja lignoceluloznih supstrata

### 3.2.5. Ekstrakcija akcesornih tvari

Za mjerenje udjela lignina korišteni su ekstrahirani uzorci. Za postupak ekstrakcije je korišteno tri grama prethodno usitnjenog i homogeniziranog uzorka. Uzorak je odvagan u ekstrakcijske tuljke i stavljen u ekstrakcijsku jedinicu. Kao otapalo korištena je smjesa otapala etanol : benzen = 50 : 50. Dodano je 50 mL otapala u prethodno osušene i izvagane ekstrakcijske posude koje su potom stavljene u ekstrakcijsku jedinicu na ploču za zagrijavanje. Ekstrakcija je provedena u dvije faze („boiling“ i „rinsing“) u ukupnom trajanju od 45 minuta na uređaju SOXTEC SYSTEM 1040 Extraction Unit (Foss Tecator). Nakon završetka ekstrakcije, ekstrakcijske posude s akcesornim tvarima su osušene pri 80°C do konstantne mase.

### 3.2.6. Određivanje udjela suhe tvari

Prije određivanja udjela TC - a, IC – a i TOC – a izmjeren je udio suhe tvari uzorka. Korištena je brza metoda pomoću halogenog vlagomjera (Mettler Toledo HR83, 2011.) (**Slika 3**). Nakon što je odabran način i temperatura sušenja, otvoren je pretinac za stavljanje uzorka i u njega je stavljen aluminijski nosač. Nakon toga, žličicom je ravnomjerno raspodjeljen uzorak na nosaču te je uređaj započeo proces sušenja. Na pisaču koji je u sklopu vlagomjera ispisana je početna masa vlažnoga zraka, temperatura svakog stupnja sušenja, gubitak vlage te konačna masa suhog uzorka i udio vlage u početnom uzorku.



Slika 3 Halogeni vlagomjer (Mettler Toledo HR83)

### 3.2.7. Određivanje udjela organskog ugljika (TC)

Uzorak za određivanje TC – a je osušen i usitnjen. Tako pripremljen uzorak odvagan je na analitičkoj vagi (XP 205, Mettler Toledo) u keramičkoj lađici (maksimalno jedan gram uzorka) te je spreman za analizu. Svaki uzorak analiziran je u tri paralelne probe. Prije analize, uzorak u lađici prekriven je tankim slojem keramičke vune. Na računaru, u programskom paketu je odabrana kalibracijska krivulja pomoću koje je određena vrijednost TC – a. Nakon toga, lađica je stavljena u komoru na TOC analizatoru (SSM-5000A Shimadzu) za određivanje ukupnog ugljika. Lađica je zatim polugom gurnuta u komoru na 900°C, te je očitana vrijednost ukupnog ugljika u uzorku.

### 3.2.8. Određivanje udjela anorganskog ugljika (IC)

Uzorak za određivanje IC – a je osušen i usitnjen. Tako pripremljen uzorak odvagan je na analitičkoj vagi (XP 205, Mettler Toledo), u keramičkoj lađici (maksimalno jedan gram uzorka). Svaki uzorak analiziran je u tri paralelne probe. Pripremljeni uzorak u lađici stavljen je u komoru TOC analizatoru za određivanje anorganskog ugljika. Neposredno prije guranja lađice u komoru na 200°C pumpicom je dodano otprilike 0,4 – 0,5 mL 25 % - tne  $H_3PO_4$ . Nakon toga, lađica je gurnuta u komoru. Vrijednost udjela anorganskog ugljika očitana je iz kalibracijske krivulje.

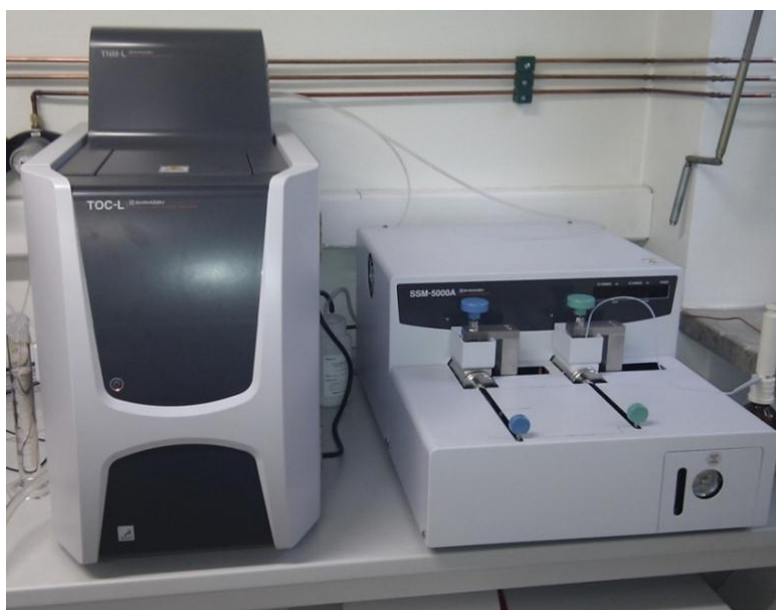
### 3.2.9. Određivanje udjela ukupnog organskog ugljika (TOC)

Metoda mjerenja TOC – a temelji se na oksidaciji organskih tvari do ugljikovog dioksida i vode. Ugljikov dioksid je kvantitativno određen metodom neraspršujuće infracrvene detekcije pri čemu je najprije određen ukupni ugljik (TC), tj. ukupna količina ugljika u uzorku, a potom anorganski ugljik (IC), tj. količina anorganskog ugljika u uzorku. Količina ukupnog organskog ugljika (TOC) jednaka je razlici vrijednosti ukupne količine ugljika i anorganskog ugljika u uzorku.

Udio TOC – a je određen prema formuli:

$$TOC (\%) = TC - IC,$$

gdje je  $TOC (\%)$  – udio ukupnog organskog ugljika u uzorku,  $TC (\%)$  – udio ukupnog ugljika u uzorku,  $IC (\%)$  – udio anorganskog ugljika u uzorku.



Slika 4 Shimadzu TOC analizator SSM-5000A (Shimadzu, 2011.)

### 3.2.10. Određivanje udjela lignina

Prije određivanja udjela lignina u uzorcima određen udio je suhe tvari na način da je izvagano  $2 \pm 0,0001$  g uzorka i osušen pri  $105^{\circ}\text{C}$  do konstantne mase.

Izvagano je  $100 \pm 0,1$  mg uzorka u Eppendorf tubicu, te je izračunata masa suhe tvari na izvaganoj količini uzorka. U prethodno izvagani uzorak dodano je jedan mililitar 72 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,

te je sadržaj izmiješan na vrtložnoj miješalici (Vortex) do otapanja uzorka. Ovako pripremljen uzorak u tubici stavljen je u vodenu kupelj na termostatanje pri 30°C kroz jedan sat. Uzorak u vodenoj kupelji povremeno je izmiješan na Vortex – u. Nakon termostatiranja, uzorak je prebačen u čašu volumena 50 mL i dodano je 28 mL vode. Čaša s uzorkom pokrivena je aluminijskom folijom te stavljena na sterilizaciju u autoklav na 121°C kroz jedan sat. Uzorci izvađeni iz autoklava ohlađeni su na temperaturu 80°C. Udio netopljivog lignina (AIR) određen je na način da se vrući uzorak profiltrirao koristeći prethodno izvagane staklene sinter lončice odgovarajuće poroznosti. Filtrat je zatim prebačen u epruvetu s čepom i sačuvan za određivanje udjela lignina topljivog u kiselini. Uzorak zaostao na staklenim sinter lončićima ispran je vrućom vodom do neutralne reakcije (provjera pomoću pH – indikatorskog papira). Stakleni sinter lončić s uzorkom zatim je osušen u sušioniku na 105°C do konstantne mase, ohlađen u eksikatoru i potom izvagan. Udio lignina topljivog u kiselini određen je spektrofotometrijski na spektrofotometru (Shimadzu, Kyoto, Japan) mjerenjem apsorbancije prethodno sačuvanog filtrata pri 205 nm.

Udio lignina koji nije topiv u kiselini je određen prema formuli:

$$AIR = \frac{m}{M} \cdot 1000 \text{ [mg/g]},$$

gdje je  $m$  – masa suhe tvari [mg],  $M$  – masa uzorka prije kiselinske hidrolize [g]

Udio lignina topivog u kiselini je određen prema formuli:

$$ASL = \frac{A \cdot D \cdot V}{a \cdot b \cdot M} \cdot 1000 \text{ [mg/g]},$$

gdje je  $A$  – absorbancija,  $D$  – faktor razrjeđenja,  $V$  – volumen filtrata ( $V= 0,029$  L),  $a$  – ekstinkcijski koeficijent ( $a= 110$  g/Lcm),  $b$  – promjer kivete ( $b=1$  cm),  $M$  – masa uzorka prije kiselinske hidrolize.

Udio ukupnog lignina je određen prema formuli:

$$UKUPNI LIGNIN = AIR + ASL$$

## **4.REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1.Razgradnja repinih rezanaca

Uzgoj mikroorganizama na repinim rezancima proveden je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima.

##### 4.1.1. Razgradnja repinih rezanaca pomoću plijesni

Uzgoj plijesni *A. niger* i *A. ochraceus* na repinim rezancima proveden je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima.

Uzorci repinih rezanaca prije određivanja udjela suhe tvari ekstrahirani su metodom opisanom u **Poglavlju 3.2.5**. Vrijednosti udjela suhe tvari iskazani su kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija, a rezultati su iskazani u **Tablici 3**.



**Tablica 3** Udio suhe tvari u uzorcima repinih rezanaca prije i nakon fermentacije s *Aspergillus niger* i *Aspergillus ochraceus*

Mikroorganizam	Uzorak	Udio suhe tvari (%)
<i>Aspergillus niger</i>	Repini rezanci (početni uzorak)	89,05 ± 0,0003
	Repini rezanci (slijepa proba 10. dan)	90,24 ± 0,0011
	Repini rezanci (slijepa proba 20. dan)	90,81 ± 0,0003
	Repini rezanci (slijepa proba 30. dan)	91,24 ± 0,0002
	Repini rezanci (fermentacija 10. dan)	92,98 ± 0,0004
	Repini rezanci (fermentacija 20. dan)	93,08 ± 0,0001
	Repini rezanci (fermentacija 30. dan)	93,50 ± 0,0003
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Repini rezanci (početni uzorak)	89,05 ± 0,0004
	Repini rezanci (slijepa proba 10. dan)	90,24 ± 0,0023
	Repini rezanci (slijepa proba 20. dan)	90,81 ± 0,0007
	Repini rezanci (slijepa proba 30. dan)	91,24 ± 0,0001
	Repini rezanci (fermentacija s 10. dan)	89,94 ± 0,0012
	Repini rezanci (fermentacija s 20. dan)	92,18 ± 0,0006
	Repini rezanci (fermentacija s 30. dan)	92,34 ± 0,0005

Udio lignina odrađen je u prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.2.10.** u početnom uzorku repinih rezanaca te nakon 45. dana fermentacije s plijesni *A. niger* i *A. ochraceus*. Rezultati eksperimentalnog određivanja su iskazani u **Tablici 4** kao srednja vrijednost određivanja ± standardna devijacija.

**Tablica 4** Udio topivog i netopivog lignina u uzorcima repinih reznaca prije i nakon fermentacije s *Aspergillus niger* i *Aspergillus ochraceus*

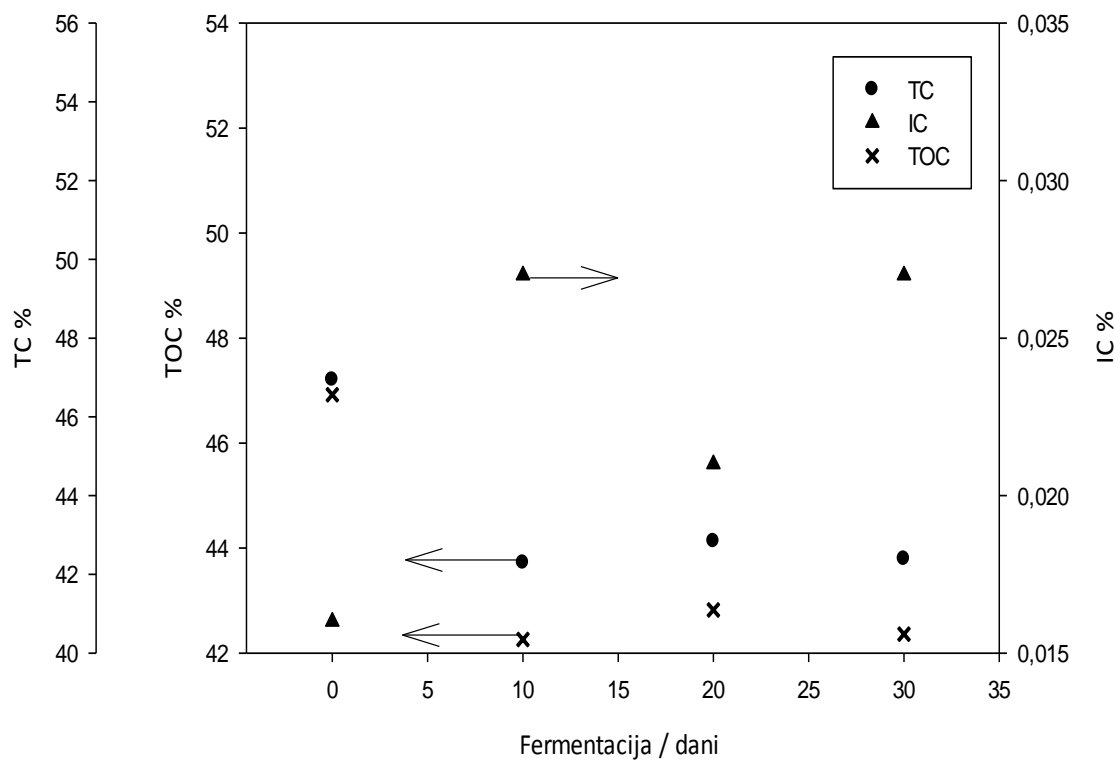
Mikroorganizam	Uzorak	Udio topivog lignina (%)	Udio netopivog lignina (%)
<i>Aspergillus niger</i>	Repini rezanci (početni uzorak)	0,1848 ± 0,0084	1,4437 ± 0,1604
	Repini rezanci (fermentacija 45. dan)	0,1530 ± 0,0004	11,8225 ± 0,1000
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Repini rezanci (početni uzorak)	0,1848 ± 0,0084	1,4437 ± 0,1604
	Repini rezanci (fermentacija 45. dan)	0,1345 ± 0,0006	4,9225 ± 0,0009

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti da je ukupan udio lignina u repinim rezancima 1,62 % što odgovara literarnim podacima. Međutim, nakon procesa fermentacije udio lignina koji nije topiv u kiselini značajno je porastao, a uzrok tome je činjenica da spore plijesni adsorbiraju na repine rezance i prilikom filtriranja uzorka na gučevima u postupku mjerenja udjela lignina došlo je do začepljenja pora gučeva sa sporama mikroorganizma. Ovi rezultati su sukladni vizualnim opažanjima, odnosno porast micelija *A. ochraceus* na repinim rezancima je bio manji u odnosu na rast micelija *A. niger*.

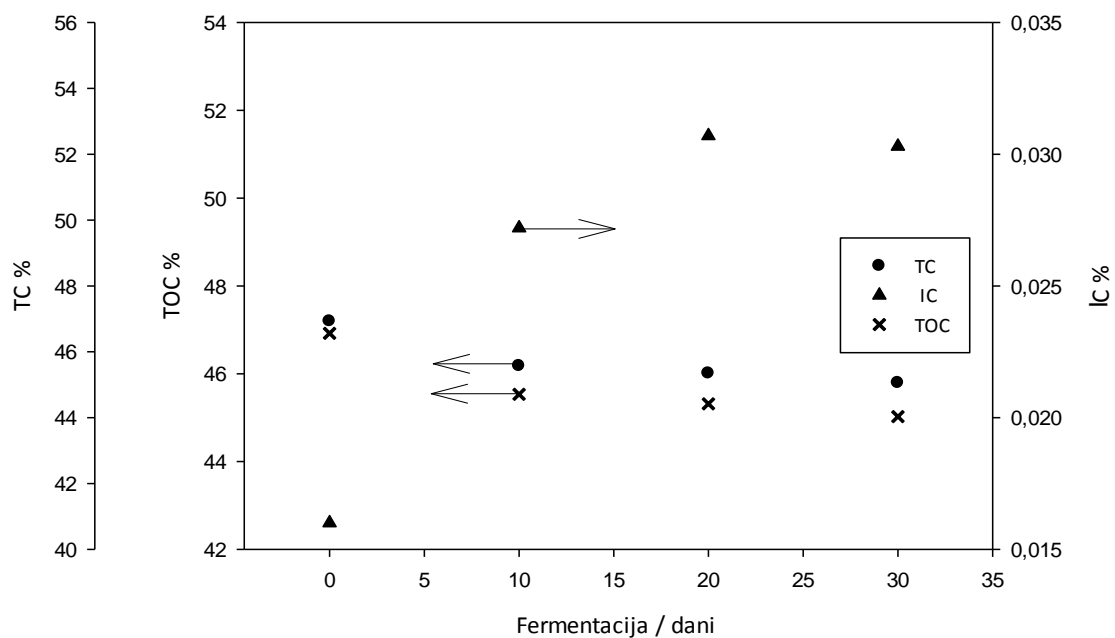
Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da ova metoda nije prikladna za određivanje udjela lignina kod supstrata koji imaju niski udio lignina a obrađivani su biološkom metodom pomoću plijesni u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

Konverzija topivog lignina je 17,21 % za uzorke fermentirane s plijesni *A. niger*, dok za uzorke fermentirane s *A. ochraceus* 5 %.

**Slika 5a** grafički prikazuje udjele TC – a, IC – a i TOC – a u uzorku repinih reznaca prije i nakon fermentacije s radnim mikroorganizmom *Aspergillus niger*, a **Slika 5b** udjele TC – a, IC – a i TOC – a u uzorku repinih reznaca prije i nakon fermentacije s radnim mikroorganizmom *Aspergillus ochraceus*



**Slika 5a** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima repinih reznaca prije i nakon fermentacije s *Aspergillus niger*



**Slika 5b** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima repinih reznaca prije i nakon fermentacije s *Aspergillus ochraceus*

Udio organskog ugljika u repinim rezancima je bio 46,94 %, udio ukupnog organskog 46,92 %, a udio anorganskog 0,0158 %.

U eksperimentima uzgoja *A. ochraceus* na repinim rezancima postignuta je konverzija TOC-a od 4,04 %, što je manje u odnosu na pokus s *A. niger* kada je konverzija TOC – a bila 9,72 %. Obzirom na porast biomase tijekom procesa fermentacije i njezinu nemogućnost odvajanja sa supstrata, za pretpostaviti je da na udio organskog ugljika utječe i nastanak biomase, te da bi stvarna konverzija bila još veća. Sukladno tome, udio anorganskog ugljika tijekom fermentacije je porastao.

#### **4.1.2. Razgradnja repinih rezanaca pomoću gljiva bijelog truljenja**

Uzgoj gljiva bijelog truljenja *C. subvermispora*, *D. squalens* i *P. chrysosporium* na repinim rezancima proveden je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima.

Uzorcima repinih rezanaca za čiju je razgradnju korišten mikroorganizam *Ceriporiopsis subvermispora* određen je udio suhe tvari metodom opisanom u **Poglavlju 3.2.6**. Vrijednosti udjela suhe tvari iskazani su kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija, a rezultati su iskazani u **Tablici 5**.

**Tablica 5** Udio suhe tvari u uzorcima repinih reznaca prije i nakon fermentacije s gljivama bijelog truljenja *C. Subvermispora*, *D. squalens* i *P. chrysosporium*

Mikroorganizam	Uzorak	Udio suhe tvari (%)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Repini rezanci (početni uzorak)	89,05 ± 0,0004
	Repini rezanci (slijepa proba 10. dan)	90,24 ± 0,0023
	Repini rezanci (slijepa proba 20. dan)	90,81 ± 0,0007
	Repini rezanci (slijepa proba 30. dan)	91,24 ± 0,0001
	Repini rezanci (fermentacija 10. dan)	91,58 ± 0,0005
	Repini rezanci (fermentacija 20. dan)	90,91 ± 0,0010
<i>Dichomitus squalens</i>	Repini rezanci (početni uzorak)	89,05 ± 0,0004
	Repini rezanci (slijepa proba 10. dan)	90,24 ± 0,0023
	Repini rezanci (slijepa proba 20. dan)	90,81 ± 0,0007
	Repini rezanci (slijepa proba 30. dan)	91,24 ± 0,0001
	Repini rezanci (fermentacija 10. dan)	91,52 ± 0,0009
	Repini rezanci (fermentacija 20. dan)	91,44± 0,0008
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Repini rezanci (početni uzorak)	89,05 ± 0,0004
	Repini rezanci (slijepa proba 10. dan)	90,24 ± 0,0023
	Repini rezanci (slijepa proba 20. dan)	90,81 ± 0,0007
	Repini rezanci (slijepa proba 30. dan)	91,24 ± 0,0001
	Repini rezanci (fermentacija s 10. dan)	91,72 ± 0,0005
	Repini rezanci (fermentacija s 20. dan)	92,11 ± 0,0008
	Repini rezanci (fermentacija s 30. dan)	92,32 ± 0,0011

Udio lignina odrađen je u prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.2.10.** u početnom uzorku repinih reznaca te nakon 45. dana fermentacije s *P. chrysosporium*. Rezultati eksperimentalnog određivanja su iskazani u **Tablici 6** kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija.

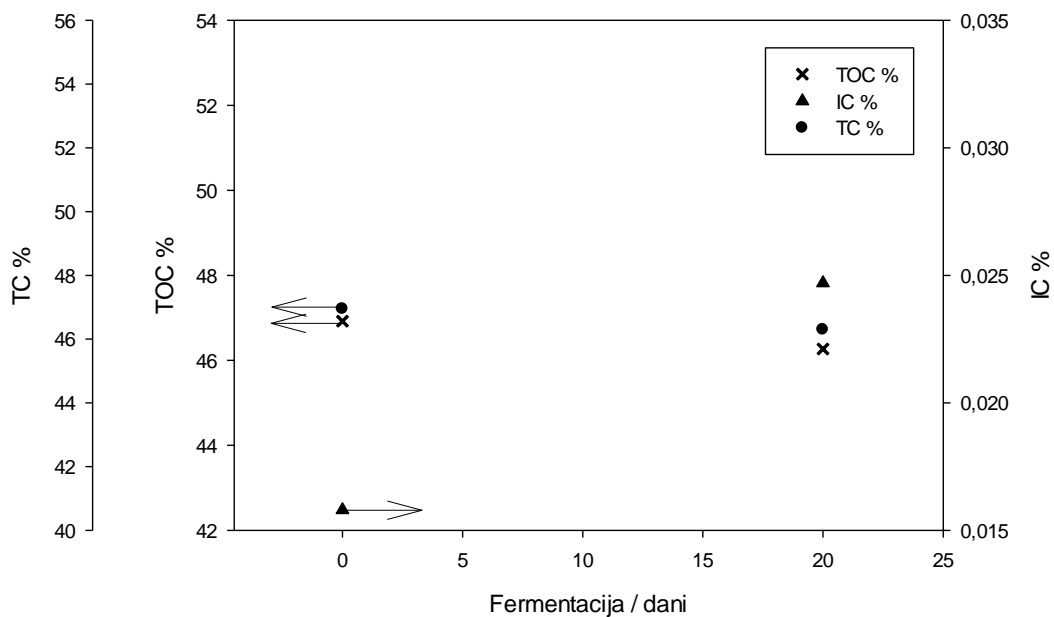
**Tablica 6** Udio topivog i netopivog lignina u uzorcima repinih reznaca prije i nakon fermentacije s *Phanerochaete chrysosporium*

Uzorak	Udio topivog lignina (%)	Udio netopivog lignina (%)
Repini rezanci (početni uzorak)	0,1848 $\pm$ 0,0084	1,4437 $\pm$ 0,1604
Repini rezanci (fermentacija 45. dan)	0,0320 $\pm$ 0,0001	1,0157 $\pm$ 0,0535

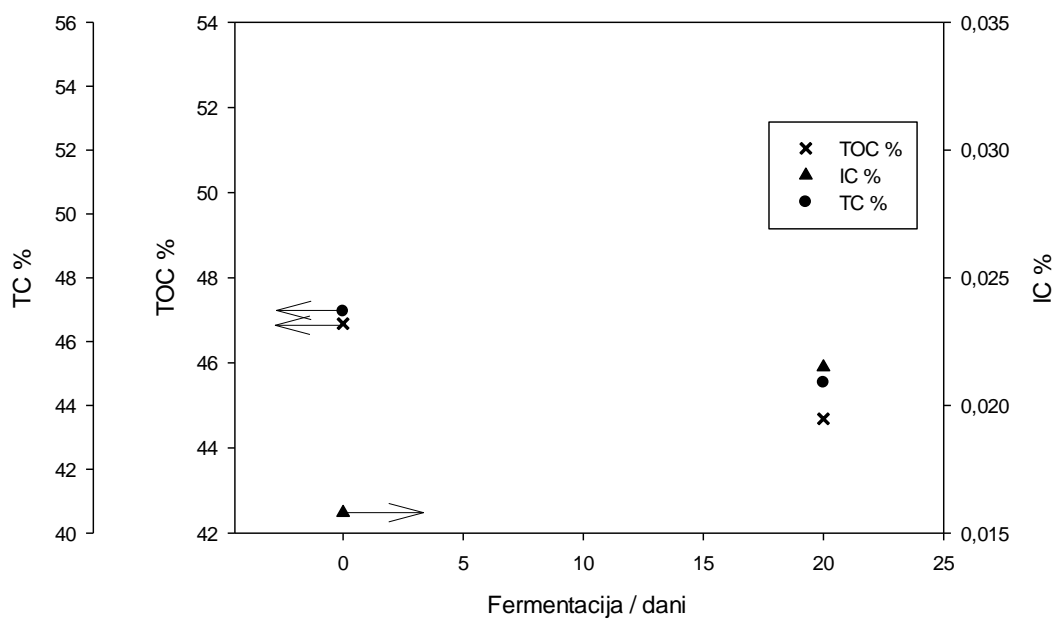
Za razliku od pokusa u kojima u svrhu razgradnje repinih reznaca korištene plijesni iz roda *Aspergillus*, kod pokusa u kojima je korištena gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium* uočen je sporiji rast micelija, a vizualno opažanje samog supstrata može se opisati kao izbjeljivanje (smanjenje intenziteta boje supstrata) uzrokovano razgradnjom lignina i porastom micelija koji je izrazito bijele boje.

Prema rezultatima udjela lignina prije i nakon 45 dana fermentacije može se izračunati konverzija od 29,65 % (netopivi lignin) i 82,68 % (topivi lignin). Obzirom da je i u ovom slučaju došlo do začepjenja pora na gučevima tijekom postupka određivanja udjela lignina uslijed nemogućnosti odvajanja spora i micelija gljive, može se pretpostaviti da je konverzija lignina u ovom slučaju i puno veća, što je u skladu s literarnim podacima koji govore da *P. chrysosporium* može razgraditi lignin.

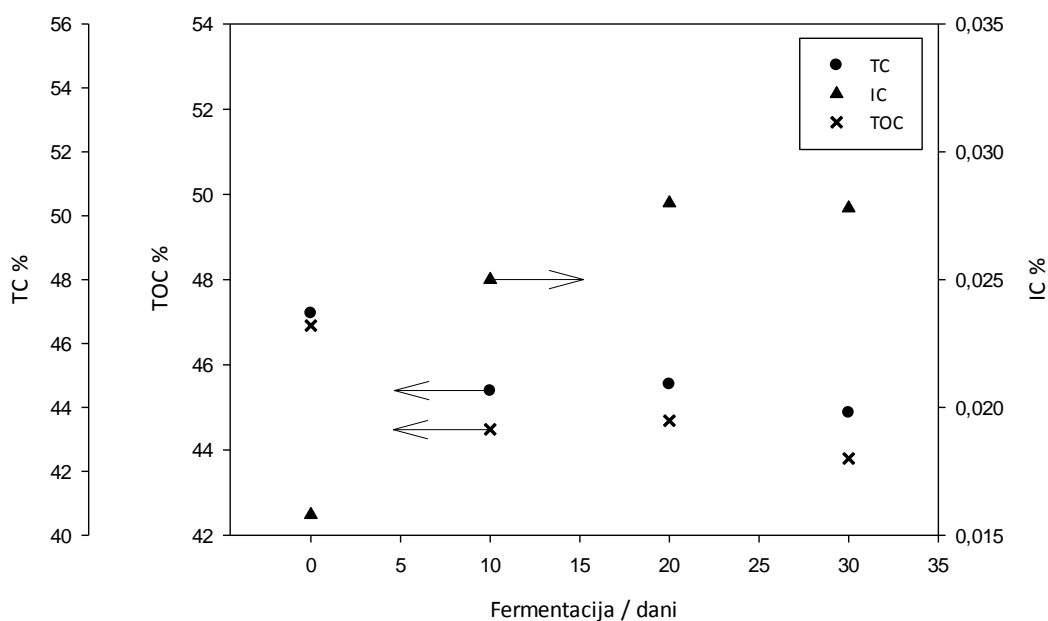
Grafički prikaz udjela TC – a, IC – a i TOC – a u uzorku repinih reznaca prije i nakon fermentacije s *C. subvermispota* prikazuje **Slika 6a**, s *D. squalens* **Slika 6b**, a s *P. chrysosporium* **Slika 6c**.



**Slika 6a** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima repinih reznaca prije i nakon fermentacije s *Ceriporiopsis subvermispora*



**Slika 6b** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima repinih reznaca prije i nakon fermentacije s *Dichomitus squalens*



**Slika 6c** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima repinih reznaca prije i nakon fermentacije s *Phanerochaete chrysosporium*

Udio organskog ugljika u početnom uzorku repinih reznaca je iznosio 46,94 %, udio ukupnog organskog 46,92 %, a udio anorganskog 0,0158 %.

Tijekom procesa fermentacije udio organskog ugljika se smanjuje i njegova konverzija iznosi 1,38 % u uzorcima fermentiranim s *C. subvermispora*, 4,75 % s *D. squalens* i 6,67 % s *P. chrysosporium*. Sukladno tome, udio anorganskog ugljika tijekom fermentacije je porastao na 0,0247 % u uzorcima fermentiranim s *C. subvermispora*, 0,0215% s *D. squalens* i 0,0278 % s *P. chrysosporium*.

Obzirom na porast biomase tijekom procesa fermentacije i njezinu nemogućnost odvajanja sa supstrata, za pretpostaviti je da na udio organskog ugljika utječe i nastanak biomase, te da bi stvarna konverzija bila još veća.



## 4.2. Razgradnja piljevine drveta bukve

Uzgoj mikroorganizama na uzorcima bukve proveden je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima.

### 4.2.1. Razgradnja piljevine bukve pomoću plijesni

Uzgoj plijesni *A. niger* i *A. ochraceus* na piljevini drveta bukve proveden je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima.

Uzorci piljevine bukve prije određivanja udjela suhe tvari ekstrahirani su metodom opisanom u **Poglavlju 3.2.5**. Vrijednosti udjela suhe tvari iskazani su kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija, a rezultati su iskazani u **Tablici 7**.

**Tablica 7** Udio suhe tvari u uzorcima piljevine drveta bukve prije i nakon fermentacije s *Aspergillus niger* i *Aspergillus ochraceus*

Mikroorganizam	Uzorak	Udio suhe tvari (%)
<i>Aspergillus niger</i>	Piljevina bukve (početni uzorak)	90,96 $\pm$ 0,0012
	Piljevina bukve (slijepa proba 45. dan)	91,52 $\pm$ 0,0003
	Piljevina bukve (fermentacija 10. dan)	91,61 $\pm$ 0,0007
	Piljevina bukve (fermentacija 45. dan)	91,66 $\pm$ 0,0002
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Piljevina bukve (početni uzorak)	90,96 $\pm$ 0,0012
	Piljevina bukve (slijepa proba 45. dan)	91,52 $\pm$ 0,0003
	Piljevina bukve (fermentacija 10. dan)	91,44 $\pm$ 0,0001
	Piljevina bukve (fermentacija 45. dan)	91,30 $\pm$ 0,0002

Udio lignina odrađen je u prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.2.10.** u početnom uzorku piljevine bukve te nakon 45. dana fermentacije s plijesni *A. niger* i *A. ochraceus*. Rezultati eksperimentalnog određivanja su iskazani u **Tablici 8** kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija.

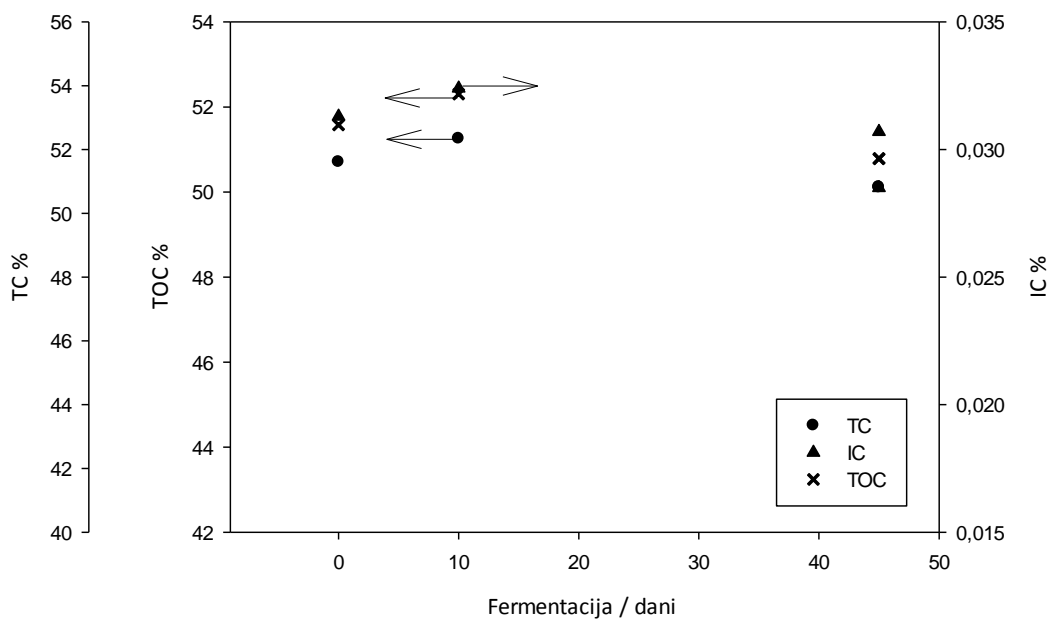
**Tablica 8** Udio netopivog lignina u uzorcima piljevine bukve prije i nakon fermentacije s *Aspergillus niger*

Mikroorganizam	Uzorak	Udio netopivog lignina (%)
<i>Aspergillus niger</i>	Piljevina bukve (početni uzorak)	22,17
	Piljevina bukve (fermentacija 45. dan)	20,35

Prema rezultatima koje prikazuje **Tablica 8** može se vidjeti da je udio netopivog lignina u piljevini bukve 22,17 % što odgovara literaturnim podacima. Nakon procesa fermentacije udio lignina koji nije topiv u kiselini smanjio se na 20,35 % te njegova konverzija iznosi 8,21 %.

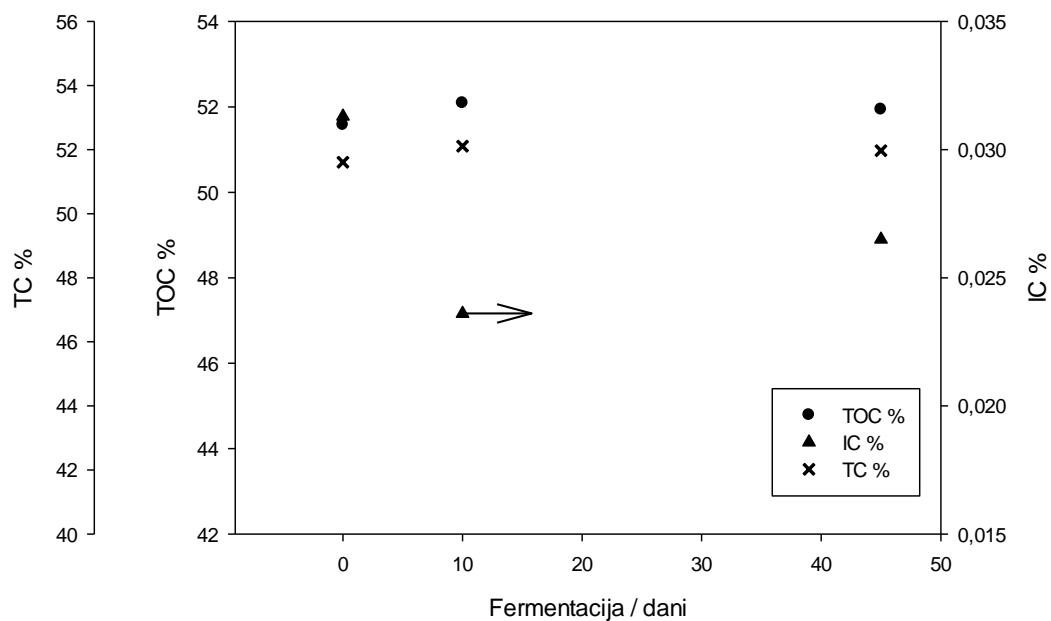
Obzirom da je u prethodnom pokusu razgradnje repinih reznaca pomoću plijesni roda *Aspergillus* pokazano da gravimetrijska metoda određivanja udjela lignina nije pouzdana za mjerenje udjela lignina u materijalima s niskim udjelom lignina koji su obrađivani pomoću plijesni, udio lignina u pokusu obrade piljevine bukve s *A. ochraceus* nije izmjeren. Vizualni izgled supstrata tijekom i nakon uzgoja s *A. ochraceus* očitovao se rastom bijelog micelija plijesni adsorbiranog na supstrat.

Udio TOC –a, TC –a te IC – a u uzorcima piljevina bukve odrađen je na početnom uzorku te u uzorcima nakon procesa fermentacije s plijesni *A. niger* i *A. ochraceus*. Rezultati eksperimentalnog određivanja grafički su prikazani na **Slici 7a** za uzorke fermentirane pomoću *A. niger* te **Slici 7b** za uzorke frementirane s *A. ochraceus*.



**Slika 7a** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima piljevine drveta bukve prije i nakon fermentacije s *Aspergillus niger*

Udio TC – a u uzorcima piljevine bukve iznosio je 51,61 %, udio TOC – a 51,58 %, a udio IC – a 0,0313 %. Udio organskog ugljika tijekom procesa fermentacije se smanjuje i njegova konverzija iznosi 1,53 %.



**Slika 7b** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima piljevine drveta bukve prije i nakon fermentacije s *Aspergillus ochraceus*

Iz rezultata prikazanim na **Slici 7b** je vidljivo da udio TOC – a iznosi 51,57 %, TC – a 51,61 %, a IC – a 0,0313 % u početnim uzorcima piljevine bukve. Tijekom procesa fermentacije, odnosno nakon 45. dana fermentacije s plijesni *A. ochraceus* udio TOC –a se povećao na 51,94 %, a suprotno promjeni udjela TOC – a, udio IC – a se smanjio nakon fermentacije na 0,0236 %.

Obzirom na porast biomase tijekom procesa fermentacije i njezinu nemogućnost odvajanja sa supstrata, za pretpostaviti je da na udio organskog ugljika utječe i nastanak biomase, te da bi stvarna konverzija bila još veća.

#### 4.2.2. Razgradnja piljevine bukve pomoću gljive bijelog truljenja

**Tablica 9** prikazuje vrijednosti udjela suhe tvari iskazane kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija izmjerene u uzorcima piljevine drveta bukve prije i nakon fermentacije s gljivom bijelog truljenja *P. chrysosporium*.

**Tablica 9** Udio suhe tvari u uzorcima piljevine drveta bukve prije i nakon fermentacije s *Phanerochaete chrysosporium*

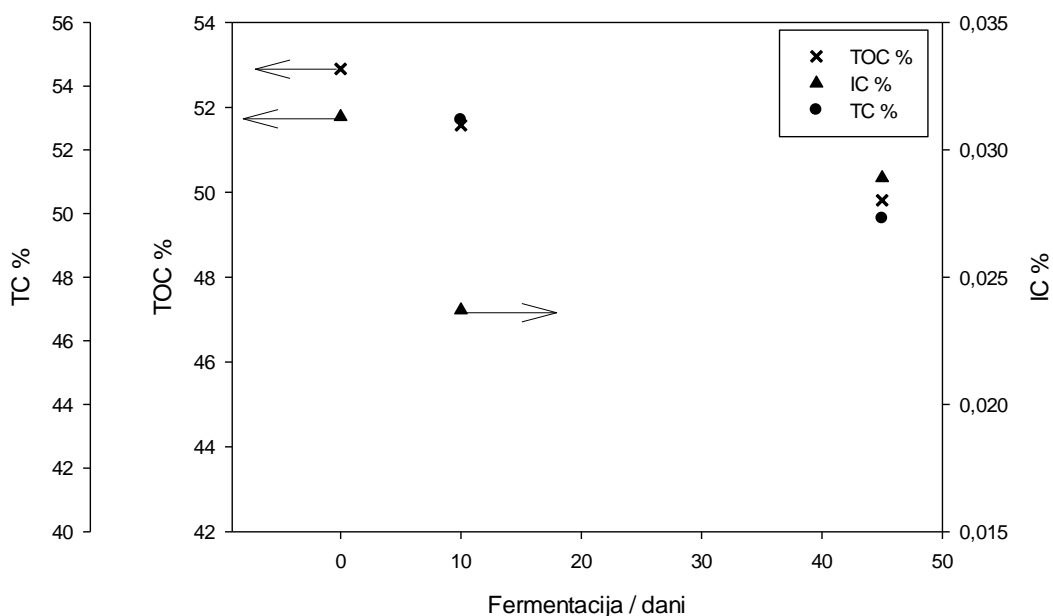
Uzorak	Udio suhe tvari (%)
Piljevina bukve (početni uzorak)	90,96 $\pm$ 0,0005
Piljevina bukve (slijepa proba 45. dan)	91,52 $\pm$ 0,0001
Piljevina bukve (fermentacija s 10. dan)	91,36 $\pm$ 0,0003
Piljevina bukve (fermentacija s 45. dan)	91,83 $\pm$ 0,0006

**Tablica 10** Udio netopivog lignina u uzorcima piljevine bukve prije i nakon fermentacije s *Phanerochaete chrysosporium*

Uzorak	Udio netopivog lignina (%)
Piljevina bukve (početni uzorak)	22.17
Piljevina bukve (fermentacija 45. dan)	19.52

Budući da je gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium* u pokusima sa razgradnjom repinih rezanaca pokazala se kao dobar mikroorganizam za razgradnju supstrata s malim udjelom lignina, primjenjena je u analizi razgradnje piljevine bukve. Uočen je sporiji rast micelija, a vizualno opažanje samog supstrata može se opisati kao izbjeljivanje materijala uzrokovano adsorpcijom bijelog micelija. Prema rezultatima udjela lignina prije i nakon 45 dana fermentacije može se izračunati konverzija netopivog lignina od 11,95 % (**Tablica 10**).

Udio TOC –a, TC –a te IC – a u uzorcima piljevina bukve odrađen je na početnom uzorku te u uzorcima nakon procesa fermentacije s gljivom bijelog truljenja *P. chrysosporium*. Rezultati eksperimentalnog određivanja grafički su prikazani na **Slici 8**.



**Slika 8** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima piljevina drвета bukve prije i nakon fermentacije s *Phanerochaete chrysosporium*

U eksperimentima uzgoja *P. chrysosporium* na piljevini drвета bukve postignuta je konverzija TOC-a od 3,41 %, dok je konverzija za TC iznosila 3,42 %. Vrijednost IC – a povećala se tijekom procesa fermentacije sa 0,0313 % na 0,0289 %.

### 4.3. Razgradnja piljevine drveta cera

Uzgoj mikroorganizama na uzorcima cera u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima.

#### 4.3.1. Razgradnja piljevine cera pomoću plijesni

Uzgoj plijesni *A. niger* i *A. ochraceus* na piljevini drveta cera proveden je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima.

Uzorci piljevine cera prije određivanja udjela suhe tvari ekstrahirani su metodom opisanom u **Poglavlju 3.2.5**. Vrijednosti udjela suhe tvari iskazani su kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija, a rezultati su iskazani u **Tablici 11**.

**Tablica 11** Udio suhe tvari u uzorcima piljevine drveta cera prije i nakon fermentacije s *A. niger* i *A. ochraceus*

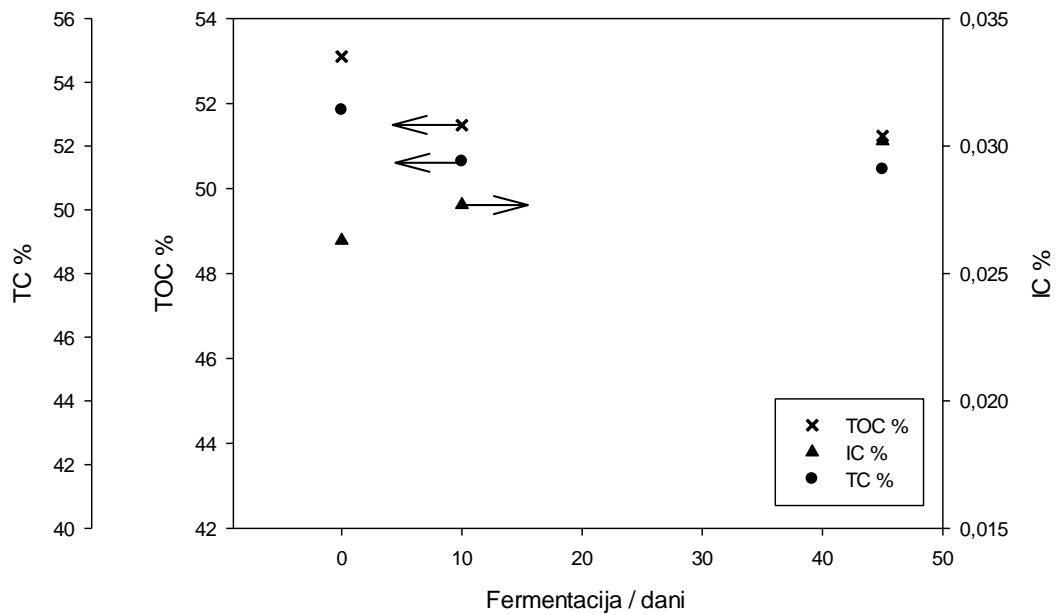
Mikroorganizam	Uzorak	Udio suhe tvari (%)
<i>Aspergillus niger</i>	Piljevina cera (početni uzorak)	92,09 $\pm$ 0,0004
	Piljevina cera (slijepa proba 45. dan)	91,83 $\pm$ 0,0007
	Piljevina cera (fermentacija 10. dan)	91,94 $\pm$ 0,0002
	Piljevina cera (fermentacija 45. dan)	91,67 $\pm$ 0,0012
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Piljevina cera (početni uzorak)	92,09 $\pm$ 0,0004
	Piljevina cera (slijepa proba 45. dan)	91,83 $\pm$ 0,0007
	Piljevina cera (fermentacija 10. dan)	91,65 $\pm$ 0,0001
	Piljevina cera (fermentacija 45. dan)	91,48 $\pm$ 0,0003

Iz dobivenih rezultata (**Tablica 12**) može se vidjeti da udio netopivog lignina u piljevini cera iznosi 25,34 %. Međutim, nakon procesa fermentacije s mikroorganizmom *A. niger* udio lignina koji nije topiv u kiselini je porastao, što je opet posljedica rasta plijesni. No, ako se ovi rezultati usporede s pokusima u kojima su korištene gljive bijelog truljenja, može se zaključiti da plijesni ne mogu razgraditi lignin, za razliku od gljiva, što je pokazano u prethodnom pokusu razgradnje bukve. Zbog svega navedenog eksperiment s *A. ochraceus* u svrhu razgradnje lignina iz cera nije proveden.

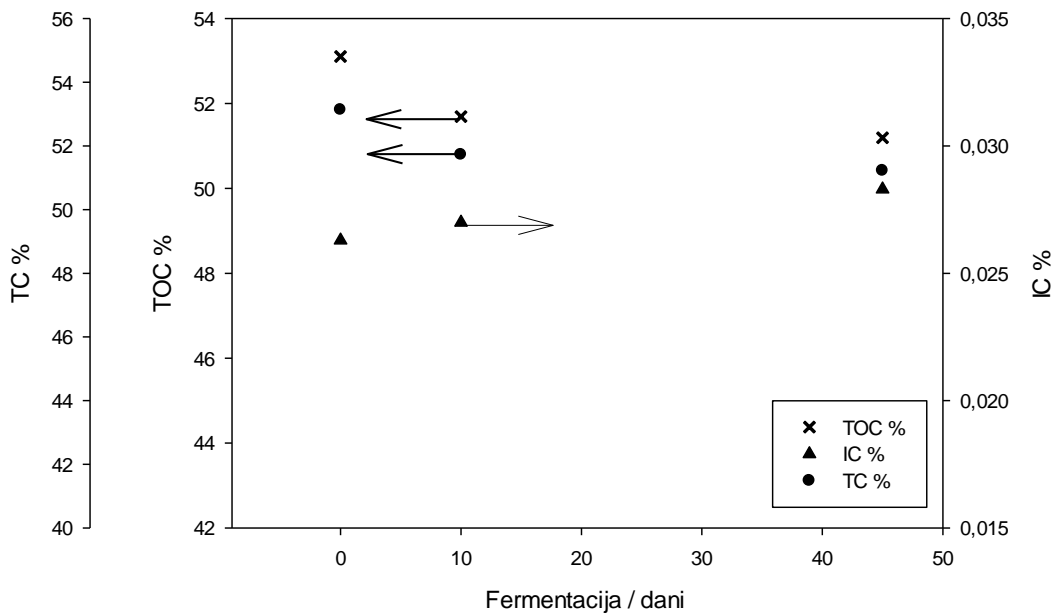
**Tablica 12** Udio netopivog lignina u uzorcima piljevine cera prije i nakon fermentacije s *Aspergillus niger*

Uzorak	Udio netopivog lignina (%)
Piljevina cera (početni uzorak)	25,34
Piljevina cera (fermentacija 45. dan)	27,25

Udio TOC –a, TC –a te IC – a u uzorcima piljevina bukve odrađen je na početnom uzorku te u uzorcima nakon procesa fermentacije s plijesni *A. niger* i *A. ochraceus*. Rezultati eksperimentalnog određivanja grafički su prikazani na **Slici 9a** za uzorke fermentirane pomoću *A. niger* te **Slici 9b** za uzorke frementirane s *A. ochraceus*.



**Slika 9a** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima piljevine drveta cera prije i nakon fermentacije s *Aspergillus niger*



**Slika 9b** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima piljevine drveta cera prije i nakon fermentacije s *Aspergillus ochraceus*



Udio organskog ugljika u početnom uzorku piljevine drveta cera je bio 53,13 %, udio ukupnog organskog 53,11 %, a udio anorganskog 0,0263 %.

Na **Slici 9a** grafički su prikazani eksperimentalni podaci dobiveni tijekom procesa fermentacije s plijesni *A. niger* iz kojih se vidi da se udio ukupnog organskog ugljika tijekom procesa fermentacije smanjuje i njegova konverzija iznosi 3,52 %.

Prema rezultatima grafičkog prikaza sa **Slike 9b** vidljivo je da konverzija za TOC nakon fermentacije s *A. ochraceus* iznosi 3,61 %, za TC 3,59 %, a promjena udjela IC – a se očitovala porastom sa 0,0263 % na 0,0270 %.

#### 4.3.2. Razgradnja piljevine cera pomoću gljive bijelog truljenja

Uzorci piljevine cera prije određivanja udjela suhe tvari ekstrahirani su metodom opisanom u **Poglavlju 3.2.5**. Vrijednosti udjela suhe tvari iskazani su kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija, a rezultati su iskazani u **Tablici 13**.

**Tablica 13** Udio suhe tvari u uzorcima piljevine drveta cera prije i nakon fermentacije s *Phanerochaete chrysosporium*

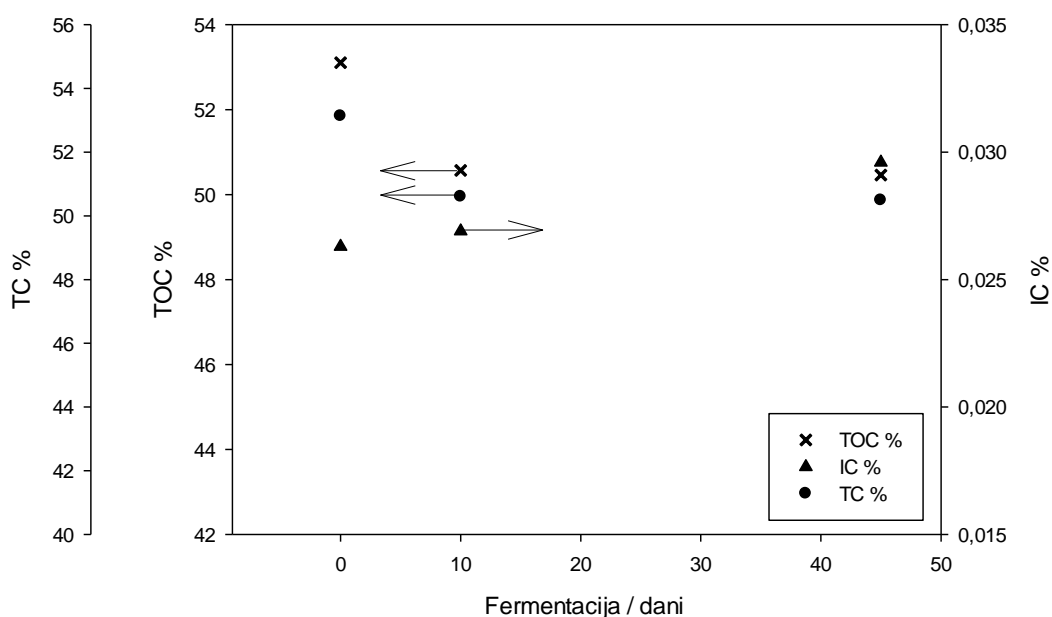
Uzorak	Udio suhe tvari (%)
Piljevina cera (početni uzorak)	92,09 $\pm$ 0,0004
Piljevina cera (slijepa proba 45. dan)	91,83 $\pm$ 0,0007
Piljevina cera (fermentacija s 10. dan)	91,84 $\pm$ 0,0001
Piljevina cera (fermentacija s 45. dan)	91,76 $\pm$ 0,0004

Udio lignina koji nije topiv u kiselini odrađen je u prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.2.10**. u početnom uzorku piljevine cera te nakon 45. dana fermentacije s *P. chrysosporium*. Rezultati eksperimentalnog određivanja su iskazani u **Tablici 14** kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija.

**Tablica 14** Udio netopivog lignina u uzorcima piljevine cera prije i nakon fermentacije s *Phanerochaete chrysosporium*

Uzorak	Udio netopivog lignina (%)
Piljevina cera (početni uzorak)	25.23
Piljevina cera (fermentacija 45. dan)	25.95

Iz rezultata koje prikazuje **Tablica 14** vidljivo je da se udio netopivog lignina povećao sa 25,23 % u početnom uzorku na 25,95 % u uzorku nakon fermentacije sa gljivom bijelog truljenja *P. chrysosporium*. Porast udjela netopivog lignina nakon procesa fermentacije uvjetovan je vezanjem spora za supstrat i nemogućnošću separacije spora od supstrata.



**Slika 10** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima piljevine drveta cera prije i nakon fermentacije s *Phanerochaete chrysosporium*

U eksperimentima uzgoja *P. chrysosporium* na piljevinama drveta cera (**Slika 10**) postignuta je konverzija TOC – a od 4,97 %, dok je konverzija za TC iznosila 4,96 %. Vrijednost IC – a povećala se tijekom procesa fermentacije sa 0,0263 % na 0,0296 %.

#### 4.4. Razgradnja piljevine drveta hrasta kitnjaka

Uzgoj mikroorganizama na uzorcima piljevine drveta hrasta kitnjaka u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima.

##### 4.4.1. Razgradnja piljevine hrasta kitnjaka pomoću plijesni

Uzgoj plijesni *A. niger* i *A. ochraceus* na piljevini drveta hrasta kitnjaka proveden je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima.

Uzorci piljevine hrasta kitnjaka prije određivanja udjela suhe tvari ekstrahirani su metodom opisanom u **Poglavlju 3.2.5**. Vrijednosti udjela suhe tvari iskazani su kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija.

**Tablica 15** prikazuje vrijednosti udjela suhe tvari iskazane kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija izmjerene u uzorcima piljevine drveta hrasta kitnjaka prije i nakon fermentacije s plijesni *A. niger* i *A. ochraceus*.

**Tablica 15** Udio suhe tvari u uzorcima piljevine drveta hrasta kitnjaka prije i nakon fermentacije s *A. niger* i *A. ochraceus*

Mikroorganizam	Uzorak	Udio suhe tvari (%)
<i>Aspergillus niger</i>	Piljevina kitnjaka (početni uzorak)	91,69 $\pm$ 0,0008
	Piljevina kitnjaka (slijepa proba 45. dan)	91,85 $\pm$ 0,0002
	Piljevina kitnjaka (fermentacija 10. dan)	91,68 $\pm$ 0,0001
	Piljevina kitnjaka (fermentacija 45. dan)	91,55 $\pm$ 0,0006
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Piljevina kitnjaka (početni uzorak)	91,69 $\pm$ 0,0008
	Piljevina kitnjaka (slijepa proba 45. dan)	91,85 $\pm$ 0,0002
	Piljevina kitnjaka (fermentacija 10. dan)	91,33 $\pm$ 0,0005
	Piljevina cera (fermentacija 45. dan)	91,26 $\pm$ 0,0006

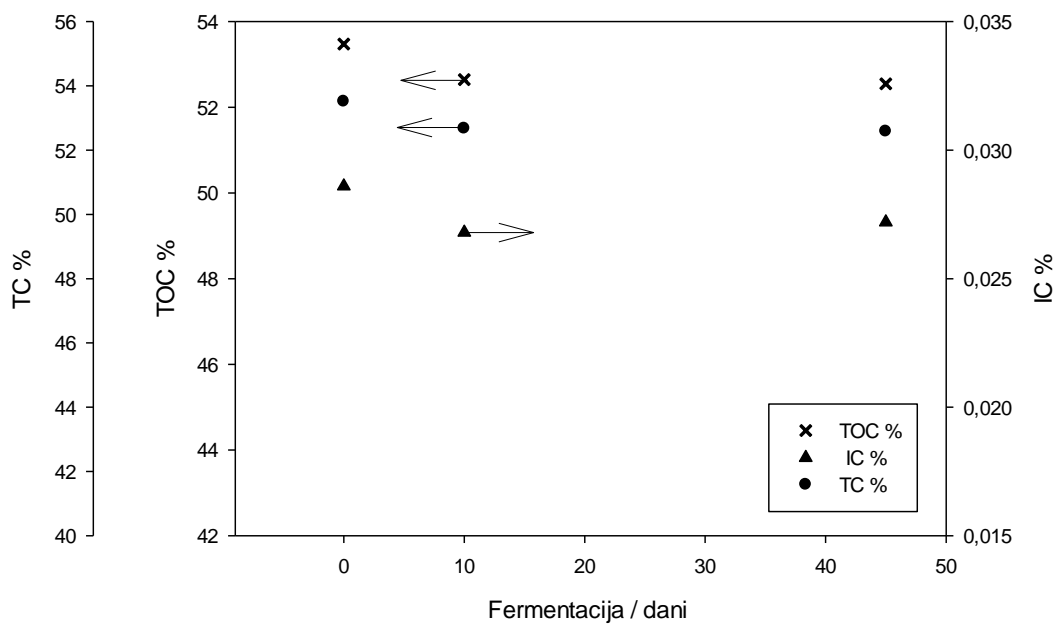
Prema rezultatima prikazanim u **Tablici 16** vidljivo je da je došlo do konverzije netopivog lignina tijekom procesa fermentacije, a ona nakon 45. dana fermentacije sa plijesni *A. niger* iznosi 7,92 %.

**Tablica 16** Udio netopivog lignina u uzorcima piljevine hrasta kitnjaka prije i nakon fermentacije s *Aspergillus niger*

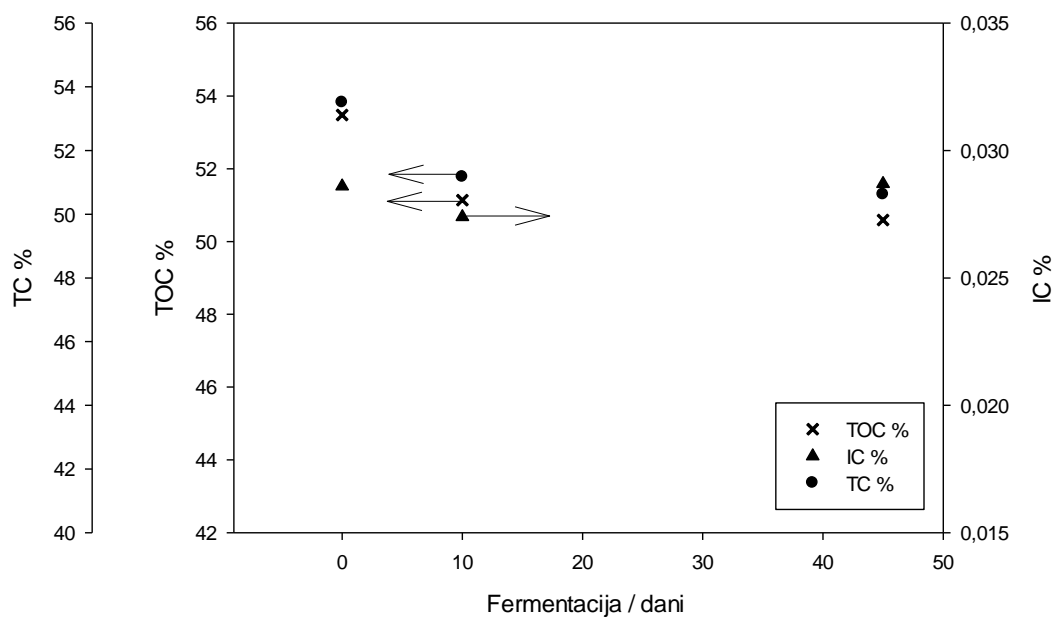
Uzorak	Udio netopivog lignina (%)
Piljevina hrasta kitnjaka (početni uzorak)	22.09
Piljevina hrasta kitnjaka (fermentacija 45. dan)	20.34

Budući da su prethodna istraživanja pokazala da gravimetrijska metoda određivanja udjela lignina nije pouzdana za mjerenje udjela lignina u materijalima koji su obrađivani pomoću plijesni, udio lignina u pokusu obrade piljevine hrasta kitnjaka s *A. ochraceus* nije izmjeren. Vizualni izgled supstrata tijekom i nakon procesa uzgoja s *A. ochraceus* očitovao se s bijelim rastom micelija plijesni adsorbiranog na supstrat.

Grafički prikaz udjela TC – a, IC – a i TOC – a u uzorku piljevine drveta cera prije i nakon fermentacije s *A. niger* prikazuje **Slika 11a**, a s *A. ochraceus* **Slika 11b**.



**Slika 11a** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima piljevine drveta hrasta kitnjaka prije i nakon fermentacije s *Aspergillus niger*



**Slika 11b** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima piljevine drveta hrasta kitnjaka prije i nakon fermentacije s *Aspergillus ochraceus*

Udio ukupnog ugljika u početnom uzorku piljevine drveta hrasta kitnjaka je bio 53,51 %, udio ukupnog organskog 53,48 %, a udio anorganskog 0,0286 %.

Na **Slici 11a** grafički su prikazani eksperimentalni podaci dobiveni tijekom procesa fermentacije s plijesni *A. niger* iz kojih se vidi da se udio ukupnog organskog ugljika, ukupnog ugljika i anorganskog ugljika tijekom procesa fermentacije smanjuje. Tako sukladno smanjenju, konverzija za TOC i TC iznosi 2,99 %, dok je za IC 6,99 %.

Tijekom procesa fermentacije s plijesni *A. ochraceus* udio TOC – a i TC – a se smanjuje, a suprotno tome udio IC – a se povećao (**Slika 11b**). Prema rezultatima iz grafičkog prikaza može se izračunati konverzija za TOC nakon fermentacije od 5,40 %, za TC 5,98 %.

#### 4.4.2. Razgradnja piljevine drveta hrasta kitnjaka pomoću gljive bijelog truljenja

**Tablica 17** prikazuje vrijednosti udjela suhe tvari iskazane kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija izmjerene u uzorcima piljevine drveta hrasta kitnjaka prije i nakon fermentacije s gljivom bijelog truljenja *P. chrysosporium*.

**Tablica 17** Udio suhe tvari u uzorcima piljevine drveta hrasta kitnjaka prije i nakon fermentacije s *Phanerochaete chrysosporium*

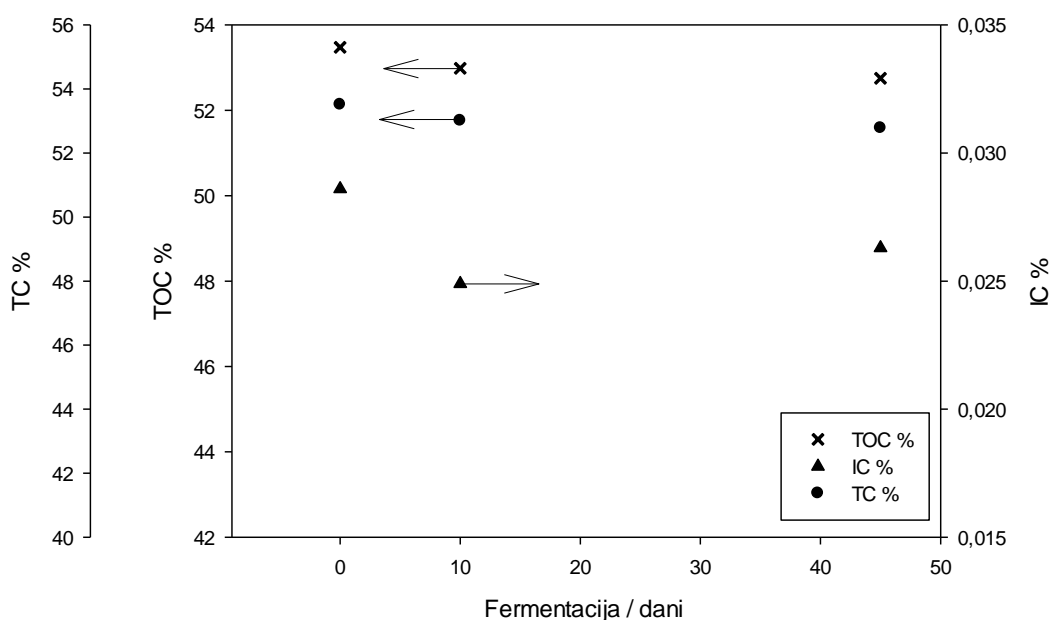
Uzorak	Udio suhe tvari (%)
Piljevina hrasta kitnjaka (početni uzorak)	91,69 $\pm$ 0,0008
Piljevina hrasta kitnjaka (slijepa proba 45. dan)	91,85 $\pm$ 0,0002
Piljevina hrasta kitnjaka (fermentacija s 10. dan)	91,68 $\pm$ 0,0004
Piljevina hrasta kitnjaka (fermentacija s 45. dan)	91,52 $\pm$ 0,0006

Udio lignina koji nije topiv u kiselini odrađen je u prema metodi opisanoj u **Poglavlju 3.2.10.** u početnom uzorku piljevine hrasta kitanjaka te nakon 45. dana fermentacije s *P. chrysosporium*. Rezultati eksperimentalnog određivanja su iskazani u **Tablici 18** kao srednja vrijednost određivanja  $\pm$  standardna devijacija.

**Tablica 18** Udio netopivog lignina u uzorcima piljevine hrasta kitnjaka prije i nakon fermentacije s *Phanerochaete chrysosporium*

Uzorak	Udio netopivog lignina (%)
Piljevina hrasta kitnjaka (početni uzorak)	22,09
Piljevina hrasta kitnjaka (fermentacija 45. dan)	19,75

Iz dobivenih rezultata prikazanih u **Tablici 18** može se vidjeti da je udio netopivog lignina u piljevini hrasta kitnjaka 22,09 % što odgovara literarnim podacima. Nakon procesa fermentacije udio lignina koji nije topiv u kiselini smanjio se na 19,75 % te njegova konverzija iznosi 10,59 %.



**Slika 12** Udio TC – a, IC – a i TOC – a u uzorcima piljevine drвета hrasta kitnjaka prije i nakon fermentacije s *Phanerochaete chrysosporium*

Udio ukupnog ugljika u početnom uzorku piljevine drвета hrasta kitnjaka je bio 53,51 %, udio ukupnog organskog 53,48 %, a udio anorganskog 0,0286 %.

Na **Slici 12** grafički su prikazani eksperimentalni podaci dobiveni tijekom procesa fermentacije iz kojih se vidi da se udio ukupnog organskog ugljika, ukupnog ugljika i anorganskog ugljika tijekom procesa fermentacije smanjuje. Tako sukladno smanjenju, konverzija za TOC iznosi 3,46 %, za TC 3,46%, dok za IC konverzija nakon fermentacije iznosi 9,09 %.

## **5. ZAKLJUČCI**



Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Nakon procesa fermentacije repinih rezanaca kao supstrata s plijesni *Aspergillus niger* i *Aspergillus ochraceus* udio lignina značajno je porastao. Uzrok tome je činjenica da spore plijesni adsorbiraju na repine rezance i prilikom filtriranja uzorka na gučevima u postupku mjerenja udjela lignina došlo je do začepljenja pora gučeva sa sporama mikroorganizma.

Prema rezultatima je vidljivo da je konverzija topivog lignina bila 5%, što je manje u odnosu na pokus s *A. niger* kada je konverzija bila 17,21 %. Ovi rezultati su sukladni vizualnim opažanjima, odnosno porast micelija *A. ochraceus* na repinim rezancima je bio manji u odnosu na rast micelija *A. niger*.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da ova metoda nije prikladna za određivanje udjela lignina kod supstrata koji imaju niski udio lignina a obrađivani su biološkom metodom pomoću plijesni u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

Udio organskog ugljika tijekom procesa fermentacije repinih rezanaca s plijesni *A. niger* i *A. ochraceus* se smanjuje. U eksperimentima uzgoja *A. ochraceus* postignuta je konverzija TOC – a od 4,04 %, što je manje u odnosu na pokus s *A. niger* kada je konverzija TOC – a bila 9,72 %.

Obzirom na porast biomase tijekom procesa fermentacije i njezinu nemogućnost odvajanja sa supstrata, može se zaključiti da na udio organskog ugljika utječe i nastanak biomase.

U eksperimentima gdje su korištene piljevine tri različite vrste drveta kao supstrata za proces fermentacije s plijesni roda *Aspergillus* na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je adsorpcija plijesni na supstrat utjecala na udio lignina.

Adsorpcija spora plijesni na supstrat očituje se začepljenjem gučeva prilikom filtriranja uzorka u postupku mjerenja udjela lignina te se na osnovu toga može zaključiti da ova metoda nije prikladna za određivanje udjela lignina za ovaj tip supstrata.

Udio organskog ugljika tijekom procesa fermentacije repinih reznaca s gljivama bijelog truljenja *D. squalens* i *C. subvermispora* se smanjuje. Iz rezultata je vidljivo da je došlo do konverzije (1,38 % za *C. subvermispora* i 4,75 % za *D. squalens*).

Obzirom na porast biomase tijekom procesa fermentacije i njezinu nemogućnost odvajanja sa supstrata, može se zaključiti da na udio organskog ugljika utječe i nastanak biomase, te da bi stvarna konverzija bila još veća.

U eksperimentima gdje je u svrhu razgradnje repinih reznaca korištena gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium* uočen je sporiji rast micelija na supstratu u odnosu na rast micelija gdje su korištene plijesni roda *Aspergillus*.

Na osnovu rezultata određivanja udjela lignina koji govore da je došlo do konverzije (od 29,65 % (netopivi lignin) i 82,68 % (topivi lignin)) može se zaključiti da gljiva bijelog truljenja može razgraditi lignin, no budući da je došlo do začepljena pora gučeva pretpostavlja se da je konverzija lignina u ovom slučaju i puno veća.

Isto kao i u eksperimentima gdje su korišteni repini rezanci kao supstrat, u eksperimentima gdje su korištene piljevine drveta je vidljivo da je došlo do konverzije lignina.

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium* može razgraditi i ovaj tip lignoceluloznog materijala.

## **6. LITERATURA**

- Al Seadi T., Rutz D., Prassl H., Köttner M., Finsterwalder T., Volk S., Janssen R.: Priručnik za bioplin, 2008.
- Andričić B: Prirodni polimerni materijali, *Priručnik*, Split, 2009.
- Antonović A.: Kemija drva – Dio I., *Interna skripta*, 2008.
- Antonović A.: Kemija drva – Dio II., *Interna skripta*, 2008.
- Babić J.: Proizvodnja šećera, 2009.
- Franjo M.: Proizvodnja lignolitičkih enzima porijeklom iz *Phanerochaete chrysosporium*, *Završni rad*, Zagreb, 2009.
- Fraser S.J.: Intraspecific comparison of *Phanerochaete chrysosporium* strains: peroxidase production, pollutant degradation and mycelial differentiation, *Doktorska disertacija*, Rhodes University, Južnoafrička Republika, 2005.
- Gracia D., Ramos A.J., Sanchis V., Marin S.: Modelling the effect of temperature and wateractivity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*, *Food Microbiology*, 28:406-417, 2011.
- Komar M.: Obezbojenje različitih bojila pomoću *Aspergillus ochraceus* i *Trichoderma harizanum*, *Diplomski rad*, Osijek, 2012.
- May G., Adams, T.: The Importance of Fungi to Man, *Genome Research*, Volume 7. p. 1041-1044., 1997.
- Mitchell D., Berovic M.: Solid state bioprocessing, *Biochemical engineering principles*, European federation on biotechnology, 204-236, 2006.
- Mussatto S. I., Teixeira J. A.: Lignocellulose as raw material in fermentation processes, 2006.
- Pilaš J.: Proizvodnja lakaze uzgojem *Trametes versicolor* na otpadu industrije pulpe i papira, *Diplomski rad*, Zagreb, 2009.
- Rahardjo, Y.S.P.: Fungal Mats in Solid State Fermentation, *Doktorska dizertacija*, 2005.
- Rozman V., Kiš D., Kralik D.: Poljoprivreda u službi proizvodnje hrane ili energije, *44. hrvatski i 4. međunarodni simpozij agronoma*, Opatija, 2009.
- Rožić M., Barbarić – Mikošević Ž., Plazonić I.: Organska kemija, *Interna skripta za vježbe*, Zagreb, 2008.
- Schidt O: Wood and Tree Fungi, Book, Hamburg, 2006.

Schuster E., Dunn – Coleman, N. Frisvad, J. van Dijck P.: On the safety of *Aspergillus niger* – a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 59. p. 426-435., 2002.

Šljivac D., Šimić Z., *Obnovljivi izvori energije*, 2009.

Tsai W. T., Chou Y. H., Chang Y. M.: Progress in energy utilization from agrowastes in Taiwan, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*,: 461 – 488, 2004.

Webster J., Weber RWS: Introduction to Fungi, *Cambridge University Press*, 528., 2007.

Xiong H: Production and Characterization of *Trichoderma reesei* and *Thermomyces Lanuginosus Xylanases*, *Disertacija*, Helsinki University of Technology, Helsinki 2004.