

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

ŠUMARSKI FAKULTET

Juraj Staneši , Tomislav Podvorec

**UTJECAJ KOLIČINE KOMPLEKSA ENZIMA I  
NATRIJEVA AZIDA ( $\text{NaN}_3$ ) NA PROCES I  
PROIZVODE ENZIMATSKE HIDROLIZE  
CELULOZE IZ DRVA CRNE TOPOLE  
(*Populus nigra* L.)**

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za kemiju drva, Zavoda za tehnologije materijala Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Alana Antonovića i doc. dr. sc. Nikole Španića te je predan na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade za individualni znanstveni i umjetnički rad u akademskoj godini 2017./2018.

## SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. KEMIJSKI SASTAV DRVA	3
2.1. Mineralne tvari	5
2.2. Akcesorne tvari (Ekstraktivi)	5
2.3. Lignin	6
2.4. Celuloza	8
2.4.1. Polimorfi celuloze	10
2.5. Hemiceluloza (drvne polioze)	11
3. UVOD U HIDROLIZU DRVA	14
3.1. Kisela hidroliza	14
3.2. Enzimatska hidroliza	15
4. CILJEVI RADA	17
5. MATERIJALI I METODE	18
5.1. Materijal – Crna topolovina ( <i>Populus nigra</i> L.)	18
5.2. Uzorkovanje, usitnjavanje i prosijavanje uzoraka drva	19
5.3. Metode izolacije glavnih kemijskih komponenata drva	20
5.4. Određivanje sadržaja alfa, beta i gama celuloze	22
5.5. Enzimatska hidroliza	24
5.6. Određivanje sadržaja suhe tvari supernatanta	25
5.7. Određivanje koncentracije D-glukoze	26
6. REZULTATI S RASPRAVOM	29
6.1. Grupni kemijski sastav drva crne topolovine ( <i>Populus nigra</i> L.)	29
6.2. Određivanje kristalnosti celuloze	29
6.3. Proizvodi enzimatske hidrolize	30
6.4. Koncentracija D-glukoze	31
6.4.1. Određivanje koncentracije D-glukoze ručnim glukometrom	31
6.4.2. Određivanje koncentracije D-glukoze UV-spektrofotometrom	32
6.5. Određivanje suhe tvari u supernatantu	36
7. ZAKLJUČCI	37
8. ZAHVALE	38
9. POPIS LITERATURE	39
10. SAŽETAK	42
11. SUMMARY	43

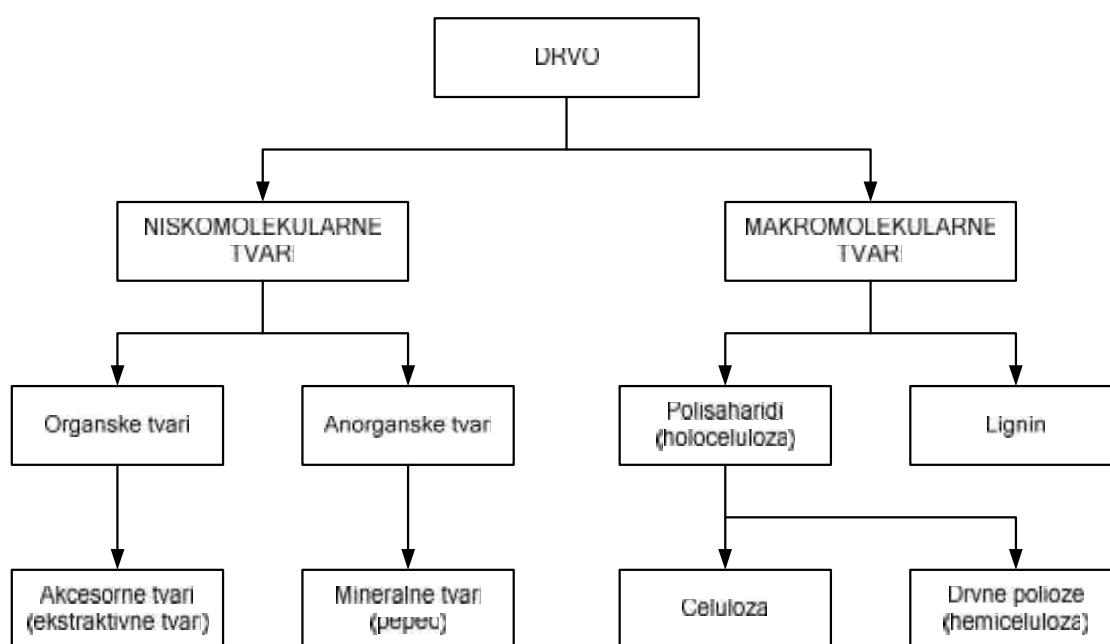
## 1. UVOD

Značajan porast potrošnje obnovljivih izvora energije (nafta, ugljen i prirodni plin) zbog ubrzanog razvoja svjetskog gospodarstva uzrokuje brže iscrpljivanje njihovih zaliha i povećanje emisije stakleničkih plinova. Stalni rast svjetske populacije kao i sve veća industrijalizacija, motorizacija i urbanizacija povećavaju potrebe gospodarstva za energijom konstantno rastu. Globalna potrošnja energije iz svih izvora 2008. godine je bila 514 EJ uz tendenciju porasta do 1000 EJ do 2050. godine, ukoliko se nastavi dosadašnji trend ekonomskog rasta. Danas se više od 80% svjetske potrebe za energijom osigurava sagorjevanjem fosilnih goriva, od čega 60% sagori u motorima transportnih vozila. Nestabilna cijena goriva i petrokemijskih sirovina, te potreba za sigurnijom dobavom energije pridonijeli su povećanju proizvodnje alternativnih goriva, tzv. biogoriva. Biogoriva se dobivaju preradom obnovljivih izvora energije, biomase. Direktiva Europskog parlamenta i Vijeća (2009) biomasu definira kao biorazgradiv dio proizvoda, otpada i ostataka biološkog podrijetla iz poljoprivrede (uključujući i tvari biljnog i životinjskog podrijetla), šumarstva i s njima povezanih proizvodnih djelatnosti uključujući i ribarstvo i akvakulturu te biorazgradiv udio industrijskog i komunalnog otpada. Prednost drvene biomase u usporedbi s fosilnim gorivima je negativna bilanca emisije CO<sub>2</sub> prilikom njenog iskorištenja tj. prerade. Time se želi reći da drvo u sebi apsorbira više ugljikovog dioksida nego što ga se u atmosferu emitira prilikom prerade drva. Drvena biomasa se upotrebljava u kućanstvima za grijanje i kuhanje, proizvodnju električne energije i topline, te sve više u proizvodnji biogoriva: etanola, metanola, biodizela i Fischer-Tropschova dizela. U odnosu na sirovine za proizvodnju goriva prve generacije, lignocelulozne sirovine su znatno jeftinije, te se ne rabe u prehrani ljudi i stoke. Bioetanol proizveden iz obnovljive lignocelulozne sirovine mogao bi dovesti do smanjenja emisije plinova koji izazivaju efekt staklenika, ali i energetske krize izazvane ograničenim rezervama fosilnih goriva. Svjetska proizvodnja biogoriva se od 1980. do 2013. godine povećala s 4,4 na 88,6 milijardi litara. Prema nekim predviđanjima godišnja proizvodnja bioetanola na svjetskoj razini do 2020. godine mogla bi premašiti 125 milijardi litara. Proizvodnja biogoriva u Europskoj uniji (EU) i Hrvatskoj, određena je strateškim dokumentima EU, "Strategija u proizvodnji i korištenju energije iz obnovljivih izvora" i uredbama Europske komisije (EC) "Inicijativa 20-20-20". Hrvatska mora kao članica EU slijediti, razvijati i podupirati energetske strategije EU. Da bi se ostvarili strateški ciljevi EU potrebno je povećati godišnju proizvodnju biogoriva iz obnovljivih sirovina (biomase) u Hrvatskoj na 260 000 tona do 2030. godine. Hrvatska ima osobito veliki potencijal u proizvodnji energije iz drvene biomase, jer je oko 50 % kopnenog teritorija pokriveno šumama. Navedeni razlozi poticanja proizvodnje biogoriva uključeni su u tri temeljne pretpostavke

održivog razvoja: ekonomski rast, ekološka ravnoteža i društveni napredak. Enzimatska hidroliza svakako je jedan od procesa kemijske prerade drva u svrhu dobivanja proizvoda visoke dodane vrijednosti. Međutim, složena struktura lignocelulozne sirovine predstavlja izvor mnogobrojnih problema u pretvorbi bioetanol. Postoje dvije glavne faze u procesu pretvorbe drvene biomase u bioetanol: 1) hidroliza prethodno izolirane celuloze iz drva i razgradnja celuloze u monomere šećera te 2) fermentacija šećera i pretvorba u bioetanol (Limayem i Ricke, 2012). Celuloza je polimer glukoze koji se procesom hidrolize lako može degradirati u monomere koji se kasnije mogu upotrebljavati u bio rafinerijama za proizvodnju goriva visoke energetske vrijednosti i u proizvodnji kemikalija. Dodavši tome, glukoza se može degradirati i dehidrirati kako bi se dobio 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), koji se kasnijom dekompozicijom može pretvoriti u levulinsku ili mravlju kiselinu u tekućem mediju. Osiguravanje odgovarajuće interakcije između celuloze i celulaza, kao enzimatskog kompleksa koji je odgovoran za efikasnost enzimske hidrolize, a samim tim i za održivost i ekonomsku isplativost cijelokupne proizvodnje bioetanol. Zbog toga se slobodno može reći da razumijevanje mehanizama enzimske depolimerizacije lignoceluloznih materijala, zajedno sa proizvodnjom novih i poboljšanih enzima može osigurati globalnu upotrebu ove vrijedne obnovljive sirovine za proizvodnju etanola i osigurati održivu i ekološki prihvatljivu proizvodnju energije. Kako bi došlo do optimizacije procesa svakako treba posvetiti pažnju osnovnim parametrima procesa hidrolize kao što su dodatak kompleksa enzima i natrijeva azida ( $\text{NaN}_3$ ) koji se u reakciji tokom procesa ponaša kao inhibitor rasta i razvoja enzima te katalizator u razgradnji celuloze.

## 2. KEMIJSKI SASTAV DRVA

Drvene su stanice kemijski heterogene ili raznovrsne i tvore polimernu mrežu strukturnih komponenata: ugljikohidrate, uglavnom su to polisaharidi celuloza i hemiceluloza (drvene polioze), i lignin. Te makromolekularne tvari nisu jednoli no raspore ene unutar stani ne stijenke drva, te njihova relativna koncentracija varira izme u razli itih dijelova stabla, no prisutni su u svim vrstama drva. Nestrukturne komponente, kao što su niskomolekularne tvari (akcesorne i mineralne) samo su mala frakcija te su uglavnom sastavljene od težinski niskomolekularnih komponenata, uglavnom smještenih izvan stani ne stijenke, te su op enito više vezane za odre ene vrste drva (Fengel i Wegener, 1989) (slika 1).



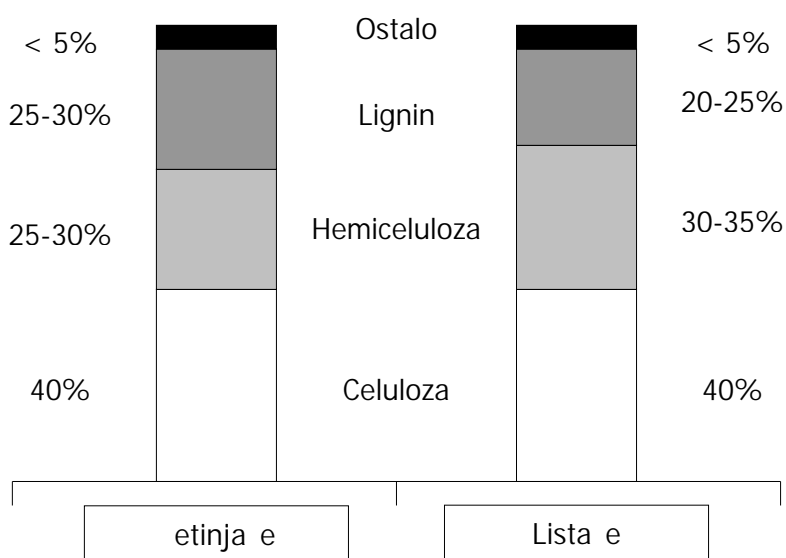
Slika 1. Grupni kemijski sastav drva prema Fengelu i Wegeneru (1989)

Op eniti kemijski sastav drva razlikuje se unutar pojedinih dijelova stabla. Tako er je poznato da postoje razlike u kemijskom sastavu drva unutar istog stabla, pogotovo u radijalnom smjeru, kao i izme u normalnoga i reakcijskog drva. Drvo je, kao i svi lignocelulozni materijali, kompleks razli itih kemijskih tvari. Pojam "kompleks" zna i da nije poznato kako su pojedine tvari drva me usobno povezane u stani nim stijenkama te jesu li te veze kemijske (kovalentne veze) ili fizikalne (molekularne veze) prirode (Fengel i Wegener, 2003).

Poznato da se rast stabla odvija pod kontrolom reakcije fotosinteze, koja uklju uje reakcije proizvode i razli ite ugljikohidrate iz ugljikovog dioksida i vode uz prisutnost klorofila i Sun evog svjetla. To zna i da je elementarni sastav drva sastavljen iz elemenata ugljika

(C), vodika (H) i kisika (O), a apsolutna suha tvar raznih vrsta drva (sušeno pri  $103\pm 2$  °C do konstantne mase) pokazuje male razlike u elementarnom sastavu. Prosječan elementarni sastav drvene tvari je: C = 49.5%, H = 6.3% i O = 44.2%. Također je poznato da u elementarni sastav drva ulazi i dušik (N), no on se zbog svog relativno malog udjela niti ne uračunava u ukupni elementarni sastav (za različite vrste drva varira između 0.10-0.17%).

Prihvata se kao uobičajeni pojam da dvije trećine suhe tvari drva je sastavljeno od polisaharida (celuloze i različitih hemiceluloza). Međutim, kada se proučava detaljnije, vidimo da se etinja i lista međusobno razlikuju na osnovu njihovih kemijskih sastava. U oba slučaja, sadržaj celuloze je više ili manje isti (40-45% na apsolutno suhu tvar), ali etinja u pravilu sadrže manje hemiceluloze a više lignina. Sadržaj hemiceluloze u etinji iznosi između 25-30%, a kod lista između 30-35% gledano na apsolutno suhu tvar. Sadržaj lignina etinji iznosi uglavnom između 25-30%, dok se sadržaj lignina u listi iz umjerenih zona iznosi između 20-25% na apsolutno suhu tvar. Ostali sastavni dijelovi (uglavnom akcesorne tvari) u drvu iz umjerenih zona uobičajeno imaju vrijednosti oko 5% gledano na apsolutno suhi uzorak (Antonovi, 2007) (slika 2). Prema tome, u vrstama drva iz umjerenih zona, makromolekularne tvari koje su sastavni dijelovi stanične stijenke tvore oko 95% ukupnog drvnog materijala. Udio i kemijski sastav lignina i polioza razlikuje se u etinji i listi, dok je celuloza jednolik sastavni dio u svim vrstama drva. Nadalje, komponente temeljene na akcesornim tvarima koje su prisutne u ovim dvjema vrstama se razlikuju u količini i strukturi.



Slika 2. Prosječni kemijski sastav etinja i lista

## 2.1. Mineralne tvari

Sokovi koji se nalaze u drvu iznose do 5% od njegove ukupne mase, a to su otopine minerala čiji sastav ovisi o tlu na kojem stablo raste, odnosno od mineralnih tvari koje se nalaze u tlu. Mineralne tvari koje su unijete iz tla u drvo kretanjem vode, podižu se kanalima drva u lišće.

U drvim iz umjerenih zona, elementi osim ugljika, vodika, kisika i dušika tvore izmeću 0,1-0,5% suhe tvari drva. Praktično, ukupni sadržaj anorganskih tvari drva se mjeri kao pepeo, čiji se ostatak dobije spaljivanjem organske tvari uzorka drva na visokim temperaturama. Pepeo sadrži uglavnom različite metalne okside, te su prosječne vrijednosti za sadržaj pepela komercijalnih vrsta četinjača i listača općenito u granicama izmeću 0,3-1,5% suhe tvari drva. Također postoji i znatna ovisnost sadržaja i sastava pepela o uvjetima prirodnog okoliša pod kojima raste stablo s jedne strane i smještaju unutar drva s druge strane.

Glavni sastojci pepela su elementi kao što su kalij, kalcij i magnezij, koji tvore oko 80% ukupnog anorganskog elementarnog sadržaja četinjača i listača. Osim njih tu su još i natrij, aluminij i željezo. Svi ovi elementi dolaze vezani u obliku karbonata, fosfata, silikata i sulfata. Pepeo drva je naročito bogat kalcijem koji čini 50-75% ukupne mase pepela iskazan kao CaO, kalijem koji čini 10-30% iskazan kao K<sub>2</sub>O, magnezija 5-10% i aluminija, željeza i natrija od 1-2%.

## 2.2. Akcesorne tvari (Ekstraktivi)

Akcesorne tvari, koje još zbog načina njihove izolacije nazivamo i ekstraktivne tvari, uključuju veliki broj različitih kemijskih tvari, koje su akumulirane u određenim tkivima drva, kao što su srž, unutarstanične šupljine (smolni kanali četinjača) i u nekim slučajevima rezervni materijal u živom dijelu drva (bijel). Sastav akcesornih tvari široko varira od vrste do vrste drva, te je ukupni sadržaj akcesornih tvari određene vrste drva ovisan o uvjetima rasta. Akcesorne tvari pokrivaju veliki raspon kemijskih komponenata iako one općenito sačinjavaju samo mali dio drva. Mogu se iz drva izolirati s polarnim otapalima (kao što su voda, metilen klorid, alkohol, i dr.) ili nepolarnim otapalima (kao što su toluen, heksan, i dr.). Akcesorne tvari djeluju kao posrednici u metabolizmu, kao rezerve energije, te kao obrana protiv napada mikroba i insekata.

Akcesorne tvari dijele se na: alifatske i alicikličke spojeve -terpeni i terpenoidi (uključuju i smolne kiseline i steroide), esteri masnih kiselina (masti i voskovi), masne kiseline i alkoholi, i alkani; Fenolne spojeve - jednostavni fenoli, stilbeni, lignani, izoflavoni i



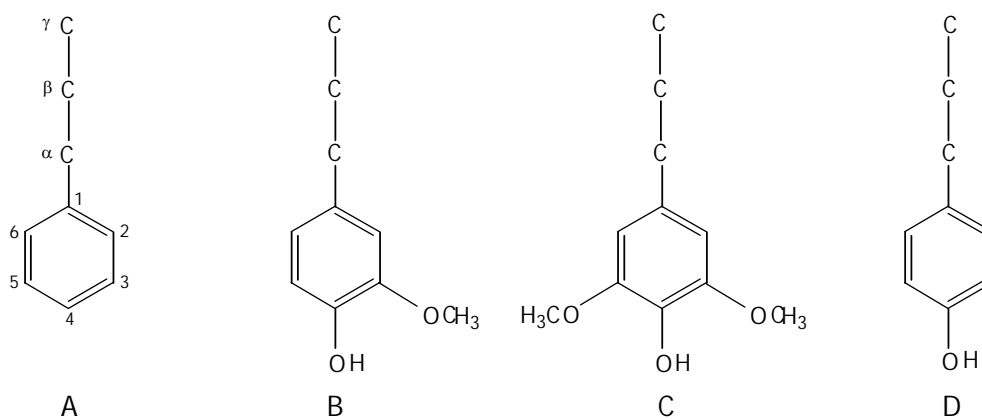
izoflavonidi, kondenziraju i tanini, hidroliziraju i tanini i flavonoidi; Ostale spojeve – šećeri, ciklotoli, tropoloni, amino kiseline, alkaloidi, kumarini i kinoni.

### 2.3. Lignin

Lignin je treća velika komponenta stanične stijenke drva (20-40%), smješten je u staničnoj stijenki i srednjoj lameli kao obložna tvar, slijede i tvorbu polisaharida, a služi kao cement između drvnih vlakana, kao sredstvo ukrivanja unutar vlakana, kao brana enzimatskoj razgradnji stanične stijenke, te je njegova fizikalna uloga ojačanje drvene strukture što relativno usko deblo može nositi cijelo stablo koje je često više i od 100 m. Kemijska je i morfološka komponenta staničnih ćelija viših biljaka, gdje izgrađuje provodni stanični je specijalizirano za provod tekućine, nosilac je mehaničkih svojstava, tj. na sebe prima sva statička i dinamička naprezanja koja se u drvu javljaju, a ima i obrambenu ulogu prilikom zarađivanja ozljeda mehaničkog podrijetla na stablima.

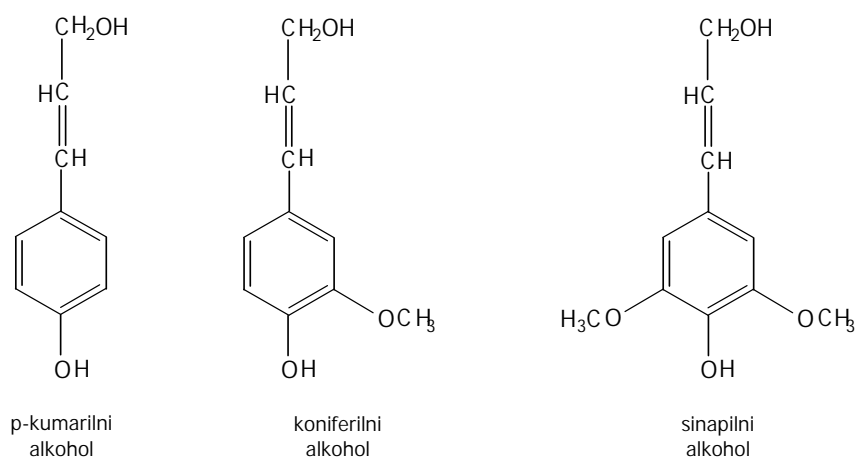
Lignini su amorfne trodimenzionalne mreže polimera fenilpropanskih jedinica (slika 3) s mnogo različitih kemijskih veza između monomera koji dovode do složene strukture koja se može objasniti samo u estalosti i rasprostranjenosti različitih veza. Ova slučajna struktura nastaje iz enzimatski iniciranog slobodnog radikala polimerizacije ligninskih prethodnika u p-hidroksicinamil alkoholne oblike. U četinjačama (koniferima), glavni lignin stvara se iz koniferilnog alkohola (3-metoksi-4-hidroksicinamil alkohol), a u lističama, glavni lignin stvaraju iz koniferilnog alkohola i sinapilnog alkohola (3,5-dimetoksi-4-hidroksicinamil alkohol) (slika 4). Prema tome, lignini četinjača i lističa razlikuju se po sadržaju metoksila, ali treba napomenuti da ove grupe nedozvoljavaju potencijalna reaktivna mjesta i smanjuju sposobnost vezivanja.

Aromatski i fenolni karakter lignina deblo ovisi o svom izvorniku, kao i o metoksilnom sadržaju. Više od dvije trećine fenilpropanskih jedinica u ligninu su vezane ugljik-kisik (eterskim) vezama, dok su ostale ugljik-ugljik veze. Ovo objašnjava utvrđene uvjete potrebne za njegovu depolimerizaciju i nesposobnost postizanja vraćanja u prvobitne monomere. Različiti tipovi funkcionalnih grupa su prisutne i u aromatskom prstenu i u bočnom lancu propana, utječu na svojstva i reaktivnost lignina.



Slika 3. Tipovi fenilpropanskih jedinica: (A) fenilpropanska jedinica, (B) gvajacilpropanska jedinica, (C) siringilpropanska jedinica, (D) p-hidroksifenilpropanska jedinica

Već je dugo poznato da se lignini etinja a, lista a i ostalih lignoceluloznih biljaka razlikuju ovisno o njihovom sadržaju gvajacilnih (G), siringilnih (S) i p-hidroksifenilnih (H) jedinica. S obzirom da klasifikacija na lignine etinja a, lista a ili drugih lignoceluloznih biljaka nije zadovoljavajuća za dobivene rezultate iz mnogobrojnih lignina, znatno pouzdaniji sustav klasificiranja je dan u kojem su svi lignini podijeljeni u tri velike grupe. Gvajacilni lignini (G lignini) dio su skoro svih etinja a, uglavnom sadrže gvajacilpropanske jedinice, a u velikom dijelu su polimerizacijski produkti koniferilnog alkohola. Gvajacil-siringilni lignini (G-S lignini) tipi ni su za lista e, uglavnom su sastavljeni od gvajacil- i siringilpropanskih jedinica, te nastaju kao kopolimeri koniferilnog i sinapilnog alkohola uz mali udio p-hidroksifenilnih jedinica, u omjeru koji varira između 4:1 do 1:2 za dvije monomerne jedinice. p-hidroksifenil-gvajacil-siringilni lignini (H-G-S lignini) tipi ni su za ostale vrste lignoceluloznih biljaka, a sastavljeni su od p-hidroksifenil-, gvajacil- i siringilpropanskih jedinica u molarnom omjeru koji je ovisan o prirodi biljne vrste.



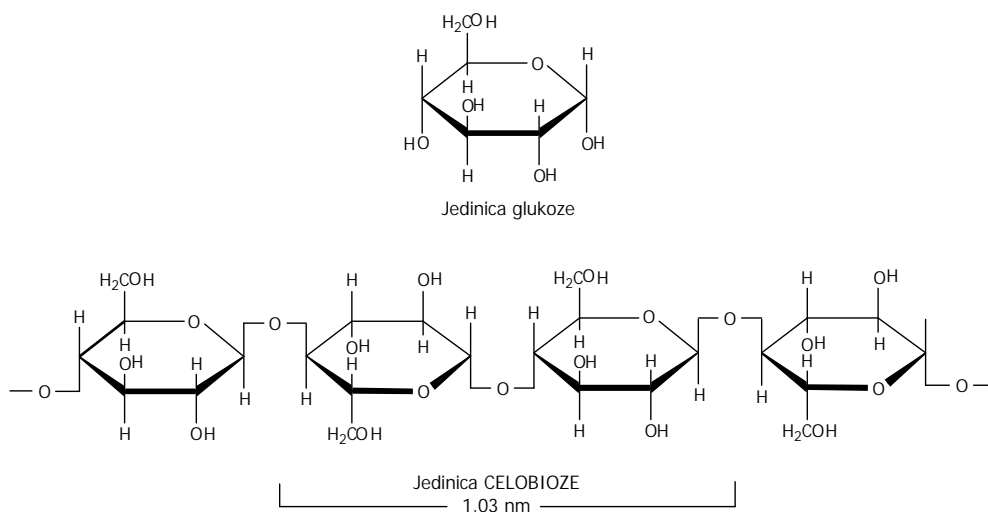
Slika 4. Osnovne građevne jedinice lignina (tzv. prethodnici lignina)

Prema dobivenim različitim produktima razgradnje lignina možemo definirati glavne tipove strukturnih jedinica lignina, gdje je više od dvije trećine fenilpropanskih jedinica u ligninu povezane eterskim vezama a ostatak ugljik-ugljik vezama. Najvažniji tipovi vezivanja strukturnih jedinica u molekuli lignina su  $\beta$ -O-4 veza kao najučestalija a za njom slijede  $\beta$ -5, 5-5,  $\beta$ -1 i  $\alpha$ -O-4 veze.

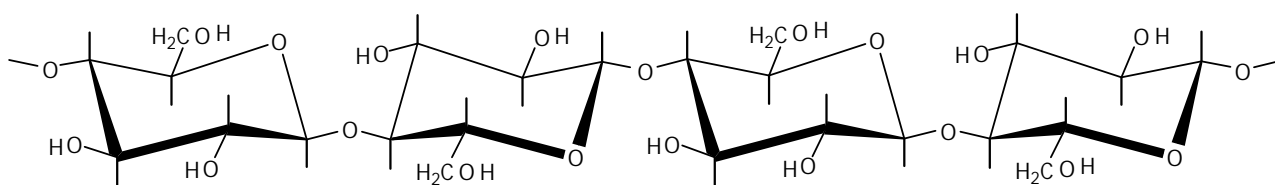
## 2.4. Celuloza

Celuloza je osnovni strukturni temelj biljnih stanica, te je kao takva najvažnija prirodna tvar koju proizvode živi organizmi. U biosferi se  $27 \cdot 10^{10}$  t ugljika nalazi u živim organizmima, od toga se 99% odnosi na biljke. U celulozi se nalazi 40% ukupnog ugljika biljaka (u ligninu 30%, u ostalim polisaharidima 26%) što odgovara količini oko  $26,5 \cdot 10^{10}$  t celuloze u svim biljkama. Distribuirana je u svim biljkama od visoko razvijenih stabala pa sve do primitivnih organizama, kao što su morske trave, jednostanični organizmi i bakterije. Najčista celuloza u prirodi je vlakno pamuka, koje sadrže 95-99% celuloze iskazano na apsolutno suhoj tvari, lan sadrži 80-90% celuloze, konoplja 65-75%, juta 60-70% i ramija oko 85% celuloze. Celuloza, kao glavni organski element drva, tvori oko 40% suhe tvari u većini vrsta drva (i u lišću i u listovima), te je predominantno smještena u sekundarnoj staničnoj stijenci. Celuloza je netopiva u vodi i organskim otapalima, što ju čini idealnim materijalom za stvaranje trajnih, a za vodu propusnih sustava kao što su biljne stanice. S tehničkog gledišta, celulozna vlakna imaju i znatnu mehaničku vrstou.

Celuloza sadrži jedinice  $\beta$ -D-glukopiranoze koje su tako povezane da tvore molekularni lanac. Prema tome, celuloza se može opisati kao linearno polimerni glukozid s jednolikom strukturom lanca. Jedinice su međusobno povezane  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama. Dvije susjedne jedinice glukoze povezane su međusobno eliminacijom jedne molekule vode izmeđ u njihovih hidroksilnih grupa na ugljiku 1 i ugljiku 4.  $\beta$ -pozicija OH-grupe na C1 zaokrenuta je za  $180^\circ$  na slijede u jedinicu glukoze oko C1-C4 osi prstena piranoze. Ponavljajuća jedinica celuloznog lanca se naziva celobiozna jedinica (osnovna organska jedinica je zapravo disaharid) s dužinom od 1,03 nm (slika 5). Kao rezultat, linearni celulozni lanac je žilav i ravan u usporedbi s heliksalnom tvorevinom frakcije  $\alpha$ -vezane amilaze škroba. Na slici 6 prikazana je stereo-kemijska formula celuloze.



*Slika 5. Kemijska formula glukoze i celuloznog lanca*

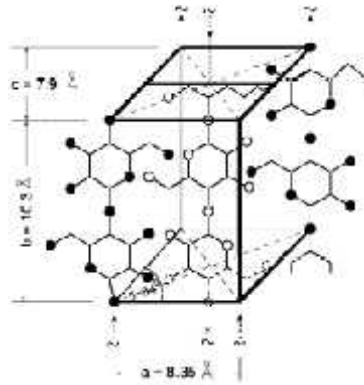


*Slika 6. Stereo-kemijska formula celuloze*

Molekularna težina celuloze široko varira (50 000-2,5 mil.) ovisno o izvoru uzorka. S obzirom da je celuloza linearni polimer s jednolikim jedinicama i vezama, veličina lanca molekule se uobičajeno definira kao stupanj polimerizacije i kreće se od 7 000-15 000 za celulozu iz biljnog materijala, a može biti manji od 1 000 za regeneriranu celulozu, pa sve od 7 000-10 000 za drvena vlaknca, te najveće i od 15 000 za pamuk. Intenzivna kemijska tretiranja kao što su vlaknjenje, bijeljenje i transformacija smanjuju jako stupanj polimerizacije. Degradacija celuloze dešava se na 240-350°C te se tako dobiju anhidroceluloza i levoglukozan.

### 2.4.1. Polimorfi celuloze

Celuloza je polimorfna te ovisno o prethodnom tretiranju uzoraka drva postoje četiri oblika celuloze. U prvom stanju vodikove veze čine uređenu, kristalnu rešetku. Oprema prihvaćeni model kristalne jedinice celuloze dali su Meyer i Misch 1937. Taj model je i danas općenito prihvaćen.



Slika 7. Meyer-Mischov model kristalne jedinice celuloze I

Nativna celuloza naziva se i celuloza I i predstavlja osnovni celulozni polimorf. Njena kristalna rešetka je monoklinskog oblika, što znači da ima tri osi različite duljine i jedan kut od  $83^\circ$  (slika 7). Celuloza I sadrži pet molekula celobioze, a svaki glukozni prsten u odnosu na susjedni zaokrenut je za  $180^\circ$  što je u skladu sa spiralnom simetrijom. Glukozni ostaci međusobno su vezani 1,4-vezama. U ovom modelu celuloze I razmak između atoma ugljika (C) je 0,154 nm, a razmak između C-O iznosi 0,135 nm (Antonović, 2007).

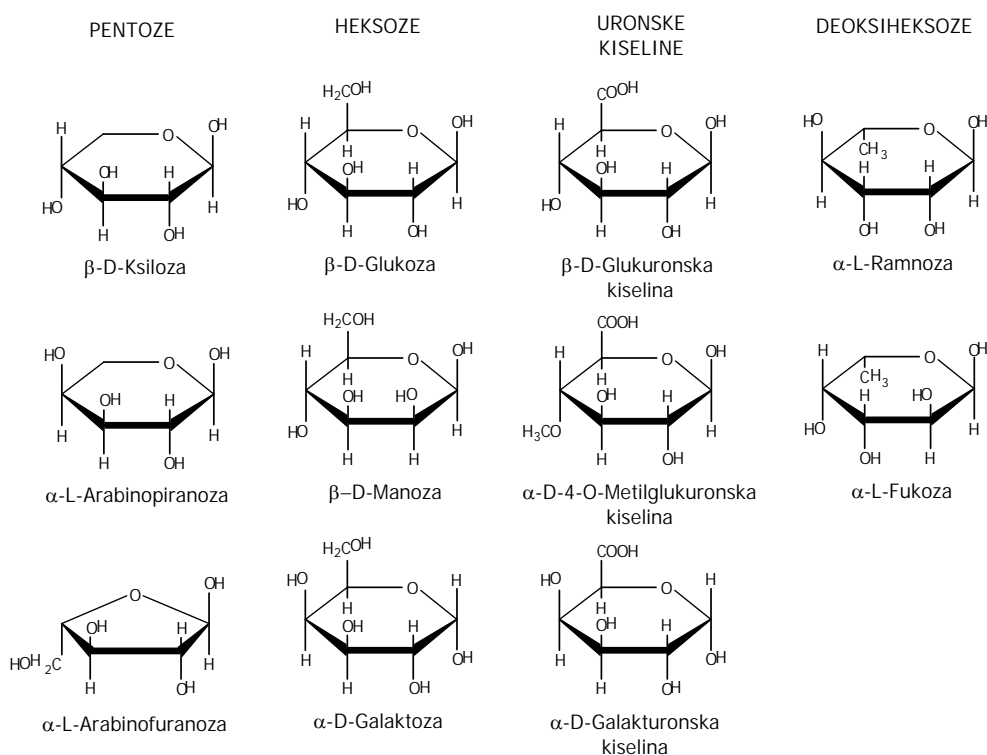
Celuloza II je drugi najvažniji oblik celuloznog polimorfa. Ne nalazi se u prirodi nego se dobiva procesom mercerizacije i regeneracijom native celuloze. Mercerizacija je tretman celuloze I jakim lužinama. Regeneracija je tretman sa karboksidisulfidom (Rowell i sur., 2005). Procesom mercerizacije, u otopini NaOH kroz određeno vrijeme dolazi do razdvajanja pojedinih polimorfa otapanjem manje kemijski postojeće frakcije, a nakon toga slijedi neutralizacija i ispiranje viška NaOH. Intermolekularne veze u strukturi celuloze II u odnosu na strukturu celuloze I su znatno drugačije i složenije. U strukturi celuloze II, osim intermolekulskih, postoji mogućnost stvaranja i intermolekularnih veza (Španić, 2014).

Celulozni polimorf III je produkt tretmana celuloze I s tekućim amonijakom pri temperaturi  $-80^\circ\text{C}$  uz kasnije obavezno ispiranje alkoholom. Alkalijskim tretmanom celuloze III dobiva se celuloza II. Celulozni polimorf IV nastaje grijanjem celuloze III u glicerolu pri  $260^\circ\text{C}$  (Rowell i sur., 2005). Celulozni polimorf IV može se dobiti bilo kojim tretmanom bilo kojeg polimorfnog oblika celuloze s prikladnim tekućim medijem na povišenoj temperaturi (Španić, 2014).

## 2.5. Hemiceluloza (drvne polioze)

Uz celulozu, u drvu kao i u ostalim biljnim tkivima još je prisutan i veliki broj različitih polisaharida koji se nazivaju polioze ili hemiceluloze, a nazivaju se još i nisko molekularne celuloze. Sadržaj hemiceluloza se kreće između 20-30% 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. Danas je poznato da hemiceluloza pripada grupi heterogenih polisaharida koji se stvaraju kroz biosintetske puteve različite nego celuloza, te je poznato da celuloza pripada grupi homopolisaharida, a hemiceluloza heteropolisaharidima. Da bi se izbjegle zabune necelulozne polisaharide ćemo nazivati polioze.

Drvne polioze se razlikuju od celuloze po sastavu različitih jedinica šećera, po mnogobrojnim molekulskim lancima i po granjanju lanca molekula. Jedinice šećera (anhidrošećeri) koji tvore polioze mogu se podijeliti na grupe kao što su pentoze, heksoze, heksouronske kiseline i deoksiheksoze (slika 8). Glavni lanac polioza može sadržavati samo jednu jedinicu (homopolimer), npr. ksilani, ili dvije ili više jedinica (heteropolimer), npr. glukomanani. Neke od ovih jedinica su uvijek ili ponekad bočne grupe glavnog lanca, npr. 4-O-metilglukuronska kiselina, galaktoza, itd.



Slika 8. Formule šećernih komponenata polioza

Klasifikacija polioza je na heksozane, pentozane i poliuronide. Ovo je dosta gruba podjela koja ne uzima u obzir da su jedinice šećera iz različitih grupa pomiješane u vešini polioza. Druga podjela koja je bazirana na ponašanju u vezama prema odvajanju od celuloze dijeli na polioze koje se mogu ekstrahirati iz holoceluloze i nazivaju se necelulozni glikozani i na ostatak koji se naziva celulozni glikozani, koji se dalje dijele na celulozne i neglukozne celulozne glikozane. Klasifikacija prema glavnim komponentama polioza pokazala se korisnom do danas, a u tom sustavu polioze se dijele na ksilane, manane, galaktane, itd. Šećer i celuloza ne samo da se razlikuju u postotku ukupnih polioza, nego isto tako i u postotku pojedinih polioza i sastavu tih polioza.

Hemiceluloza se degradira na temperaturama od 200-260 °C, daju i više hlapljivih tvari, manje katrana i manje ugljena od celuloze. Vešina hemiceluloze ne sadrži značajnu količinu levoglukozana. Vešina octene kiseline koja se oslobodi iz drva tijekom pirolize pripisuje se deacetilaciji hemiceluloze. Hemiceluloza lista a bogata je ksilanima i sadrži manju količinu glukomanana. Hemiceluloza celuloza a pak sadrži manju količinu ksilana, ali je bogata galaktoglukomananima. Po etak termi ke degradacije hemiceluloze dešava se pri nižim temperaturama od kristalizacije celuloze. Gubitak hemiceluloze zbiva se pri sporijem pirolizi drva u temperaturnom rasponu od 130-194 °C, gdje se vešina izgubi iznad 180 °C. Međutim, relevantnost karakteristika degradacije hemiceluloze u usporedbi s celulozom nije poznata tijekom brze pirolize, zbog završetka postupka samo u nekoliko sekundi te pri brzim rasponima zagrijavanja.

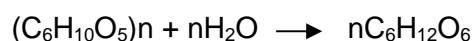


*Slika 9.* Uzorak ekstrahiranog drva u procesu određivanja količine holoceluloze



### 3. UVOD U HIDROLIZU DRVA

Proces pretvorbe lignocelulozne biomase u fermentiraju e še ere naziva se hidroliza. Kompletna hidroliza celuloze kao rezultat daje glukozu dok su proizvodi hidrolize hemiceluloze pentoze i kesoze od kojih se najviše isti u manozu i ksiloza (Taherzadeh i Karimi, 2007) Tako se isti procesi pretvorbe, kemijska pretvorba i fermentacija sirovine koji su ve na komercijalnoj razini i kojima se proizvode npr. etanol, mlije na kiselina, lizin itd. iz glukoze iz sirovine bogate škrobom, mogu se koristiti i u proizvodnji glukoze dobivene hidrolizom celuloze. Najve i izazov hidrolize celuloze je razbijanje b-veza u kristalnoj strukturi kojima su vezani glukoza i celuloza. Op enito hidrolizu možemo podijeliti u dvije razli ite vrste. Prva je kiselna hidroliza i u procesu kemijske hidrolize se koriste kiseline kao katalizatori. Druga je enzimatska hidroliza i u procesu enzimatske hidrolize ulogu katalizatora preuzimaju enzimi celulaze. Celulaze kataliziraju reakciju vode s lan anim polimerima molekula glukoze kako bi se polimerne molekule razbile i postale monomerne molekule glukoze u reakciji kako slijedi:



gdje je:  $H_2O$  voda,  $(C_6H_{10}O_5)_n$  lanac molekula glukoze koji se esto naziva i glukan i  $C_6H_{12}O_6$  je monomer glukoze.

#### 3.1. Kiselna hidroliza

Glavna prednost kisele hidrolize je razgradnja lignina bez potrebe za predtretmanom lignocelulozne biomase. Na taj na in se polimeri celuloze i hemiceluloze razbijaju u individualne molekule še era. Nekoliko tipova kiseline se može koristiti, kao što su sumporna, klorovodi na, fluorovodi na, fosforna, duši na itd. bilo kao koncentrirane ili razrije ene (Galbe i Zacchi, 2002). Sulfatna i klorovodi na kiselina se naj eš e koriste kao katalizatori za hidrolizu lignocelulozne biomase (Lenihan i dr., 2010). Za koncentriranu kiselu hidrolizu naj eš e se koriste kiseline koncentracija 30-70%. Proces se odvija pri niskoj temperaturi te se tako postiže visok prinos glukoze iz celuloze (cca. 90% prinos glukoze) (Iranmahboob i dr., 2002). S druge strane, takav proces zahtjeva velike koli ine kiseline koje mogu prouzro iti koroziju i kvar na opremi. Prednost razrije ene kisele hidrolize je mala koli ina kiseline u procesu (2-5%). No ipak, taj proces se odvija pri povišenim temperaturama kako bi se postigao željeni prinos pretvorbe celuloze u glukozu. Visoke temperature pove avaju razinu razgradnje še era iz hemiceluloze i pritom se formiraju toksi ne

komponente kao što su furfurali i 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). Veliki nedostatak kisele hidrolize je utjecaj na okoliš zbog velike količine kiselinskih ostataka u procesu.

### 3.2. Enzimatska hidroliza

Enzimi su proteini velike molekularne težine koji se ponašaju kao katalizatori. Enzimi su specifični, prilagodljivi i vrlo efektivni biološki katalizatori koji postižu veće rezultate pretvorbe od kemijske hidrolize i još k tome pri sobnim uvjetima. Celuloza i hemiceluloza može biti hidrolizirana različitim enzimima. Kvaliteta i količina substrata, aktivnost enzima, metoda predobrade ulazne sirovine te uvjeti procesa hidrolize kao što su pH vrijednost i temperatura znaju utjecati na konačne proizvode hidrolize. Optimalni uvjeti za enzimatsku hidrolizu su pH u rasponu 4-5 te temperatura inkubacije uzorka u rasponu 40-50°C (Taherzadeh i Karimi, 2007).

Celulaze su proteini koji razgrađuju celulozu i koji se generalno razvrstavaju u tri glavne skupine:

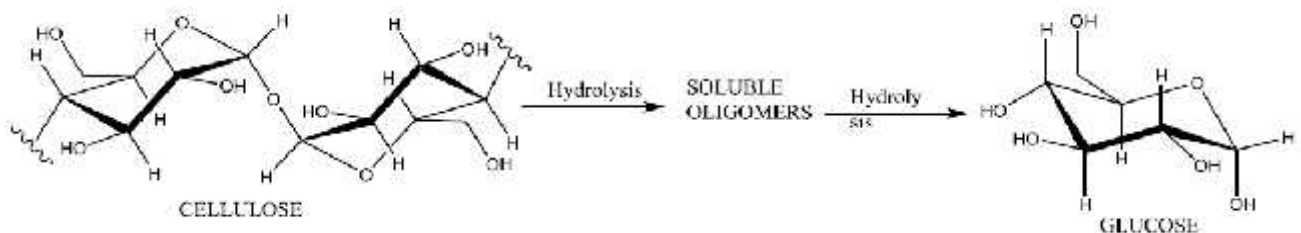
- 1) *endoglukanaze*- napadaju područja manje kristalnosti celuloze te pritom stvaraju slobodne radikale
- 2) *exoglukanaze*- još ih se naziva i celobiohidrolaze koje hidroliziraju 1,4 – glikozidne veze u lancu celobioze
- 3) *b-glukozidaze*- pretvaraju di- i oligo-saharide u glukozu

Uz ove glavne tri skupine enzima celulaze postoje i mnogi enzimi koji razgrađuju hemicelulozu kao što su glukoronidaze, acetilsteraze, ksilanaze, b-ksilozidaze, galaktomanaze i glukomanaze. Ovi enzimi sinergijski surađuju u razgradnji holoceluloze (celuloze i hemiceluloze). Celulaze se proizvode raznim bakterijama i gljivama koje mogu imati različite celulolitičke mehanizme. Upotreba enzima u hidrolizi je efektivnija od hidrolize s anorganskim katalizatorima jer enzimi ciljano razgrađuju željene veze i molekule te su sposobni za rad u blagim okolnim uvjetima. Ipak, valja spomenuti i nedostatke korištenja enzima u procesu hidrolize. Jedan je svakako tržišna cijena enzima. Također, valja spomenuti i kako su enzimi na visokim temperaturama nestabilni i teško ih je izdvajati iz konačne smjese te ih oporabiti. Kako bi se smanjila cijena koštanja samog procesa, trenutno se razvijaju enzimi koji su termostabilniji. Oni imaju povećanu aktivnost i fleksibilnost. Mogu se koristiti na povišenim temperaturama što u konačnici smanjuje vrijeme hidrolize (Wyman i dr., 2005).

Mogućnost enzima celulaze da razgrađuje celulozu ograničavaju mikrofibrili. Uzimajući u obzir međumolekularne veze uklopljene u metricu polisaharida u drvu uključujući i lignin te ostale polimere, stani na stjenka je kruta i enzimatski teško razgradiva (Wyman,

2001). Iako se mogu pojaviti određene modifikacije celuloze prilikom njene purifikacije, promjer mikrofibrila ostaje otprilike isti (3-5 nm) au staničnoj stjenici ali se dužina istih može značajno smanjiti. Mogućnost prodora celuloze u strukturu polimera celuloze podložno je dvama ograničenjima. Jedno je kristalnost celuloze i mogućnost vezanja celuloze za ostale hidrofilne skupine putem CBH I modula (Torget i dr., 1992). Drugi je anatomski struktura stanične stijenke koja također utječe na mogućnost celuloze da razgrađuje celulozu. Cilj svakog predtretmana treba biti svakako smanjiti utjecaj tih dvaju čimbenika na razvoj razgradnje celuloze.

Na temelju pretpostavke da je enzimatska hidroliza celuloze površinska reakcija, jedno od najutjecajnijih obilježja biomase trebala bi biti dostupnost površine celuloze za prodor celuloza (Li i dr., 2003). Dostupnost celuloze također se može povezati s ostalim faktorima vezanim za supstrate predtretiranja kao što su kristalnost celuloze ili depolimerizacija. S druge strane mnogi radovi ističu važnost utjecaja veličine estice i volumena pora stanica drva na proces enzimatske hidrolize celuloze (Diaz-Pontones i Garcia-Lara, 2000).



*Slika 10.* Prikaz kemijskog procesa pretvorbe celuloze u glukozu  
(Morales-delaRosa, S. i dr., 2014.)

## 4. CILJEVI RADA

U ovom radu istraživani je utjecaj ulazne količine kompleksa enzima celulaze te ulaznu količinu natrijeva azida ( $\text{NaN}_3$ ) kao inhibitora rasta enzima na proces i krajnje proizvode enzimatske hidrolize drva crne topolovine (*Populus nigra* L.). Osnovni ciljevi rada koji su bili predmetom istraživanja, a vezani su za istraživanje procesa i proizvoda enzimatske hidrolize su određivanje:

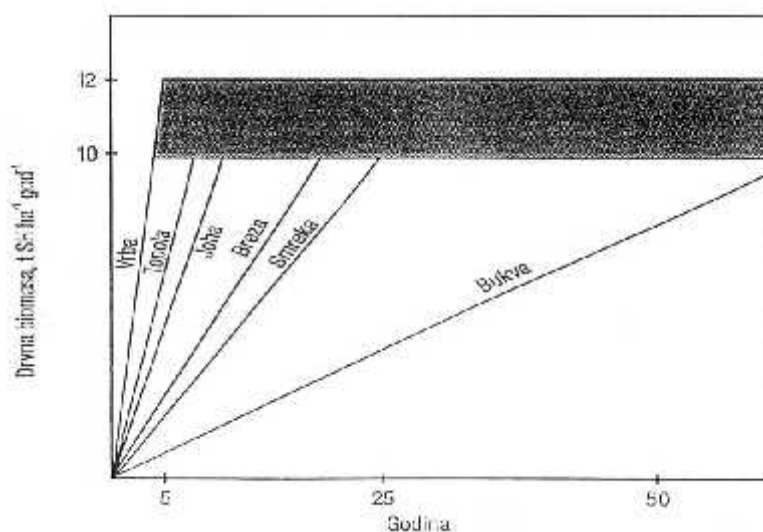
- grupnog kemijskog sastava drva crne topolovine,
- količine razgrađene celuloze u ovisnosti o ulaznoj količini enzima celulaze
- količine razgrađene celuloze u ovisnosti o ulaznoj količini natrijeva azida ( $\text{NaN}_3$ )
- koncentracija otopljene D-glukoze u ovisnosti o ulaznoj količini kompleksa enzima
- kretanje koncentracije otopljene D-glukoze u ovisnosti o ulaznoj količini natrijeva azida ( $\text{NaN}_3$ ) u jednakim vremenskim razmacima od 24 sata
- sadržaj suhe tvari supernatanta

Nadalje, kao jedan od osnovnih ciljeva, je da rezultati ovog istraživanja pridonese boljem razumijevanju problematike pretvorbe celuloze u D-glukozu, te se kao takvi poslužit u daljnjem razvoju proizvodnje i proizvodnih tehnologija enzimatske hidrolize.

## 5. MATERIJALI I METODE

### 5.1. Materijal – Crna topolovina (*Populus nigra* L.)

Za potrebe istraživanja izabrana je vrsta drva crna topolovina (*Populus nigra* L.). Crna topola je listopadno stablo iz porodice vrba (Salicaceae). Naraste do 30 m visine. Deblo je u prosjeku promjera oko 150 cm. Kora je u početku sivobijela i glatka, kasnije postane crna i duboko uzdužno naborana. Pupoljci su kupasto ušiljeni, smolaste površine. Listovi su trokutasti, zeleni na obje strane, dugi 5-8 cm, široki 6-8 cm, nazubljenih rubova, ušiljenog vrha, nalaze se na duga kim peteljka. Dvodomna je vrsta, muški i ženski cvjetovi nalaze se na zasebnim biljkama. Cvjetovi su skupljeni u rese, muške rese su crvene, duge oko 7,5 cm, ženske su zelenožute, duge 4-5 cm. Cvatu u ožujku i travnju. Plodovi su zelenosmeđe kapsule koje sadrže svijetlosmeđe sjemenke prekrivene dlačicama. Dozrijevaju u lipnju. Godišnje proizvodi preko 20 milijuna sjemenki koje vjetar može rasprostraniti na goleme udaljenosti. Kao kultivar crne topole najpoznatiji je jablan "Italica". Rasprostranjena je u srednjoj i južnoj Europi, u jugozapadnoj i srednjoj Aziji, te u sjeverozapadnoj Africi. Staništa su joj svijetla i vlažna područja, raste na obalama rijeka i jezera, sadi se kao ukrasna biljka u gradovima. Vrlo brzo raste, živi do 300 godina. Razmnožava se sjemenom, korijenovim izbojima i drvenastim reznicama. Drvo crne topole je meko, lako se obrađuje, male trajnosti, koristi se u stolarstvu za izradu namještaja, za iverice i sl. (Izvor: <http://www.plantea.com.hr/crna-topola>). Crna topola je svakako jedna od glavnih predstavnica brzorastu ih vrsta šumskog drve a jer već kroz 7 godina intenzivnog rasta može producirati 10-12 t/ha suhe mase (slika 11).



Slika 11. Produkcija biomase nekih šumskih vrsta drveća prema Christersson et al. (1993)

## 5.2. Uzorkovanje, usitnjavanje i prosijavanje uzoraka drva

Uzorci su se uzimali netom nakon sječe stabala, iz kolutova debljine 5-15 cm, s prvog trupca od panja, otprilike na visini 2 m (TAPPI T257 cm-02- Uzorkovanje i priprema drva za analize; Sampling and preparing wood for analysis). Ta je metoda prikladna za uzorkovanje drva za sve vrste kemijskih analiza i reakcija kemijske prerade drva, a dani postupak opisuje uzorkovanje za sve oblike uzoraka drva (trupce, grane, korijenje, sječu ili drvnu prašinu). Uzorkovanje se provodilo pod ingerencijom Uprave šuma Bjelovar, odnosno u šumariji Daruvar. Uzorci crne topole uzorkovani su u šumskom predjelu: Kantari; odjel, odsjek: 13D; starost: 20 godina; tip tla: lesivirano tlo; fitocenoza: alohtona crnogorica; nadmorska visina: 150 m. Prosječni prsni promjer uzoraka bio je 25,4 cm. Uzorci drva su nakon dopreme iz sastojina (transportirani su istog dana kada je obavljena sječa) u laboratorij ostavljeni da se prosuše na sobnoj temperaturi (laboratorijski uvjeti) tijekom 14 dana. Treba napomenuti da su svi uzorci bili bez ijedne greške drva i svježi.

Prije usitnjavanja drva crne topolovine uklonjena je kora te je pohranjena za neka druga istraživanja. Nadalje, otkorani uzorci drva usitnjeni su u mlinu za usitnjavanje Fritsch – Pulverisette 19 (snaga 2 kW, brzina rotora 2800 rpm, izlazna granulacija 0,25-6 mm) do određene dimenzije granula drva (TAPPI T264 cm-97). Uzorci drva usitnjeni su radi postizanja potpune penetracije otapala u uzorak i osiguranja jednoličnosti reakcija tijekom kemijskih analiza. Za prosijavanje je upotrijebljena laboratorijska elektromagnetna tresilica Cisa RP.08 (frekvencija trešnje 6 kHz – srednje snage, vibracijska amplituda 1.5mm, vrijeme trešnje = 30 min). Uzorci su prosijani kroz standardizirano sito (ISO – 3310.1) dimenzije oka 0,25 mm (100–150 oka/cm<sup>2</sup>). U tablici 1. su navedene karakteristike kolutova uzoraka crne topolovine.

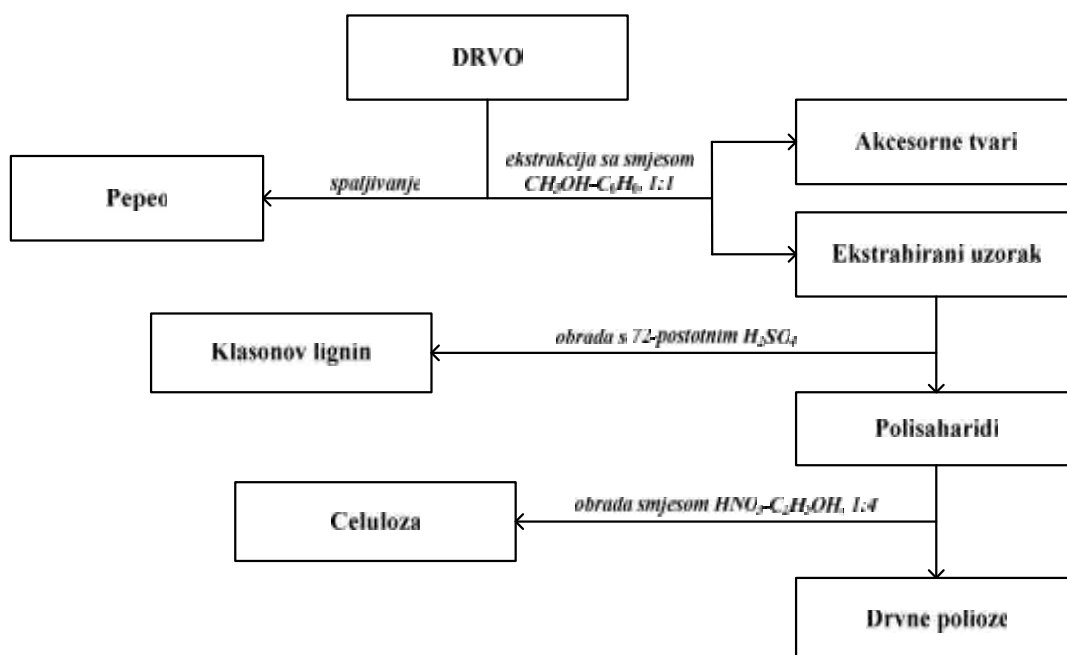
Tablica 1. Uzorci drva crne topolovine

Broj uzorka	Promjer uzorka (cm)	Debljina kore (cm)	Debljina bijeli (cm)	Debljina srži (cm)	Kora (%)	Bijel (%)	Srž (%)
1	29,0	1,5	6,5	21,0	5,2	22,4	72,4
2	28,4	1,3	5,7	21,4	4,6	20,1	75,3
3	31,2	1,7	7,9	21,6	5,5	25,3	69,2

### 5.3. Metode izolacije glavnih kemijskih komponenata drva

Metode izolacije za određivanje sadržaja komponenata grupnog kemijskog sastava drva napravljene su na temelju prijašnjih istraživanja (Antonovi i dr., 2007; Sluiter i dr., 2005a; Sluiter i dr., 2005b; Sluiter i dr., 2008). Za određivanje kemijskog sastava drva nasumično su izabrana tri koluta, s tim da je svaki kolut predstavljao jedno stablo crne topole. Nakon usitnjavanja i prosijavanja svakog koluta uzeto je po deset uzorka na kojima su napravljene sve kemijske metode izolacije glavnih komponenata drva, a rezultati prikazani u tablici 3. prosječne su vrijednosti tih deset uzoraka.

Analize kemijskog sastava crne topole sastoje se od niza metoda izolacije glavnih komponenata drva, što se može shematski prikazati prema slici 12. Manji dio pripremljenog uzorka najprije je iskorišten za određivanje sadržaja pepela, a drugi, veći dio za prethodnu ekstrakciju uzorka (sa smjesom otapala metanola,  $\text{CH}_3\text{OH}$  i benzena,  $\text{C}_6\text{H}_6$  u volumnom omjeru 1:1), da bi se iz uzorka uklonile akcesorne tvari koje bi smetale tijekom daljnjih kemijskih analiza (na taj je način kao zaostala kruta tvar određen sadržaj akcesornih tvari). Nadalje, iz ekstrahiranih je uzoraka izoliran lignin sumporne kiseline ili Klasonov lignin (s 72-postotnom sumpornom kiselinom,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) i polisaharidi celuloza (sa smjesom otapala dušične kiseline,  $\text{HNO}_3$  i etanola,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  u volumnom omjeru 1:4) te drvene polioze (hemicelulozu). Udio ukupnog sadržaja drvnih polioza u uzorku određen je računski. Sve upotrijebljene kemikalije visokog su stupnja čistoće (p.a) i dobivene su iz komercijalnih izvora.



Slika 12. Shematski prikaz metoda izolacije glavnih komponenata drva

Postupak izolacije sastoji se od (slika 12):

1.) određivanje sadržaja pepela (P) – spaljivanjem 2-3 g uzorka u porculanskom lon i u električnoj peći, na temperaturi od 525 °C tijekom 30 min (TAPPI T211 om-02). Postotak pepela izražava se prema izrazu:

$$P = \frac{a}{b} \times 100 [\%]$$

gdje je a – masa pepela (g), b – masa apsolutnoga suhog uzorka (g);

2.) određivanje sadržaja akcesornih tvari (AT) – ekstrakcijom 10-30 g usitnjenog uzorka u Soxhletovoj aparaturi sa smjesom otapala benzen-metanol u omjeru 1:1 tijekom 8 sati, te sušenjem u sušioniku na temperaturi od 80 °C do konstantne mase (TAPPI T204 cm-97). Iz dobivenih se podataka izražava postotak akcesornih tvari:

$$AT = \frac{b - a}{c} \times 100 [\%]$$

gdje je a – masa prazne tikvice (g), b – masa tikvice s osušenim akcesornim tvarima (g) i c – masa apsolutno suhog uzorka (g);

3.) određivanje sadržaja Klasonova lignina (L) – kuhanjem ekstrahiranog uzorka (metanol-benzen, 1:1) prethodno obrađenog 72-postotnim H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,5 sata), uz dodatak vode, tijekom 4 sata. Filtriranjem i sušenjem u sušioniku, na temperaturi 105±2 °C do konstantne mase dobije se lignin kao kruti ostatak (TAPPIT222 om-06). Sadržaj lignina izražava se na osnovi izraza:

$$L = \frac{b - a}{c} \times 100 [\%]$$

gdje je a – masa praznog lon i a za filtriranje (g), b – masa lon i a s ligninom (g) i c – masa apsolutno suhog uzorka (g);

4.) određivanje sadržaja holoceluloze (HC) - izolacija holoceluloze izvršena je kloritnom metodom prema Wiseu u tekućem mediju. Odvagnuto je 50 g uzorka (+/- 0,1 g) bez ekstraktivnih tvari te je dodavano ukupno 90 g natrij klorita (NaClO<sub>2</sub>), 60 ml octene kiseline (CH<sub>3</sub>COOH) i 1600 ml destilirane vode. Smjesa se konstantno miješala i zagrijavala pomoću elektromagnetske miješalice proizvođača IKA C-MAG tip HS 7. Kemikalije su dodavane u pravilnim koracima po isteku svakog pojedina sata reakcije. Po isteku svakog sata u reakcijsku smjesu je dodavano 15 g natrij klorita i 10 ml octene kiseline. Ukupno trajanje reakcije iznosilo je 5 sati, a održavana temperatura tokom procesa iznosila je 70°C. Po



isteku 5 sati, reakcijska smjesa je ohla ena te filtrirana. Tako isfiltriran uzorak se sušio pri sobnim uvjetima 24 sata te je potom i tehni ki sušen u sušioniku na temperaturi od 30 °C tijekom 24 sata. Ovako pripremljena hiloceluloza sušena je pri blagim uvjetima jer se pri visokoj temperaturi holoceluloza degradira. Sadržaj holoceluloze izra unava se prema izrazu:

$$HC = \frac{b - a}{c} \times 100 [\%]$$

gdje je a – masa praznog filter papira (g), b – masa filter papira s holocelulozom (g) i c – masa apsolutno suhog uzorka (g);

5.) odre ivanje sadržaja celuloze (C) – kuhanjem 1 g ekstrahiranog uzorka (metanol-benzen, 1:1) sa smjesom HNO<sub>3</sub> i CH<sub>2</sub>OH u omjeru 1:4 do izbijeljenog taloga te njegovim filtriranjem i sušenjem u sušioniku, na temperaturi 105±2 °C, do konstantne mase. Sadržaj celuloze izra unava se prema izrazu:

$$C = \frac{b - a}{c} \times 100 [\%]$$

gdje je a – masa praznog lon i a za filtriranje (g), b – masa lon i a za filtriranje sa celulozom (g) i c – masa apsolutno suhog uzorka (g);

6.) odre ivanje sadržaja drvnih polioza (DP) - hemiceluloze – udio ukupnih drvnih polioza nije posebno odre ivan ni analiziran, ve je odre en ra unski, na osnovi udjela ostalih komponenata u uzorku. Sadržaj drvnih polioza izra unava se prema izrazu:

$$DP = 100 - (\% P + \% AT + \% C + \% L) \quad [\%]$$

#### 5.4. Odre ivanje sadržaja alfa, beta i gama celuloze

Metoda za odre ivanje alfa, beta i gamma celuloze (*T 203 cm-99*) – Ispitni uzorak potrebno je staviti u visoku ašu volumena 300mL te dodati 75mL 17,5% natrijevog hidroksida (NaOH) kondicioniranog na 25° ± 0.2°C. Važno je zabilježiti vrijeme dodavanja reagensa. aša sa uzorkom pozicionira se na elektromagnetsku mješalicu i mješa se dok uzorak nije potpuno promješšan sa otopinom. Pritom valja pripaziti da zrak ne do e u doticaj sa uzorkom. Ukoliko je ostalo uzorka na stijenci treba ga vratiti u otopinu pomo u staklenog štapi a. Nakon toga dodaje se dodatnih 25mL 17,5% natrijevog hidroksida (NaOH) tako da sveukupni volumen bude 100mL reagensa dodanog uzorku. Zatim se stavlja uzorak u kupelj na kondicioniranje pri 25° ± 0.2°C. Nakon 30 minuta od prvog dodavanja NaOH reagensa, dodaje se 100mL destilirane vode kondicionirane na 25° ± 0.2°C u ašu sa uzorkom te se promješa sa staklenim štapi em. Potom se uzorak opet vra a u kupelj na 30 minuta tako da

je ukupno vrijeme  $60 \pm 5$  minuta. Na kraju perioda od 60 minuta, filtrira se uzorak te se odbacuje prvih 10–20 mL filtrata. Zatim se prikuplja otprilike 100mL filtrata u tikvicu za filtriranje (Büchner tikvica). Valja naglasiti kako se ne smije ispirati ili prati uzorak sa vodom i ne smije se provlađiti zrak kroz uzorak. Alfa, beta i gama celuloze određuju se kako slijedi:

1.) Određivanje alfa celuloze- Pipetira se 25mL filtrata i 10mL otopine 0.5N kalijevog dikromata u tikvicu volumena 250mL. Pri dodavanju 50mL sumporne kiseline ( $H_2SO_4$ ) ru no mješati tikvicu. Ostaviti otopinu da bude vruća 15 minuta te staviti 50 mL destilirane vode i ohladiti na sobnu temperaturu. Nakon toga dodaje se 2 do 4 kapi Ferroin indikatora i titrira sa 0.1N otopinom amonij sulfata do ljubičastog obojenja. Na kraju treba napraviti titraciju slijepa probe s 12,5mL 17,5% natrijevog hidroksida (NaOH) te 12,5mL destilirane vode.

$$\% = 100 - \frac{6.85 (V_2 - V_1) \times N \times 20}{A \times W}$$

gdje je:  $V_1$ - volumen titiranog filtrata (ml),  $V_2$ - volumen titrirane slijepa probe (ml), N- to na normalnost otopine željezovog amonij (II) sulfata ( $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ), A- volumen filtrata koji se koristi u oksidaciji (ml) i W- masa apsolutno suhog uzorka (g)

2.) Određivanje beta i gama celuloze -Pipetirati 50mL filtrata u 100mL menzuru sa staklenim epom. Dodaje se 50mL 3N sumporne kiseline ( $H_2SO_4$ ) i dobro se promješa okretaju i. Menzura se zagrijava u vrućoj vodi na  $70-90^\circ C$  nekoliko minuta kako bi beta celuloza kristalizirala. Nakon toga ostavlja se menzura dok se kruta tvar ne nataloži na dno menzure te dok se otopina ne razbistri. Zatim u tikvicu od 300mL pipetirati 50mL iste tekućine i 10 mL 0.5N kalijevog dikromata i nakon toga oprezno se dodaje 90 mL sumporne kiseline ( $H_2SO_4$ ). Ostaviti otopinu da bude vruća 15 minuta te se pokrene titracija s 0.1N otopinom amonij sulfata do ljubičastog obojenja. Na kraju treba napraviti probnu titraciju s 12,5mL 17,5% natrijevog hidroksida (NaOH), 12,5mL destilirane vode i 25mL 3N sumporne kiseline ( $H_2SO_4$ ). Gama celuloza računski se dobiva slijedećim izrazom:

$$\% = [6.85 (V_4 - V_3) \times N \times 20] / [25 \times W]$$

gdje je:  $V_3$ - titracija otopine nakon taloženja beta celuloze (mL) i  $V_4$ - probna titracija (mL)

Sadržaj beta celuloze računski se dobiva slijedećim izrazom:

$$\% = 100 - (\text{alfa celuloza \%} + \text{gama celuloza \%})$$

## 5.5. Enzimatska hidroliza

Za enzimatsku hidrolizu koristila se celuloza prethodno izolirana iz drva crne topolovine (*Populus nigra* L.). Za razgradnju celuloze koristio se kompleks enzima komercijalnog naziva Cellic Ctec2 proizvođača Novozymes iz Danske. Kompleks Cellic Ctec2 sastoji se od: agresivnih celulaza, hemicelulaza i visokog udjela β-glukozidaza.

Hidroliza celuloze odvijala se u Erlenmayer-ovoj tikvici volumena 300 mL u otopini pufera natrijeva citrata ( $C_6H_5Na_3O_7$ ) s pH 5,8 i natrijeva azida ( $NaN_3$ ). Ulazna masa apsolutno suhe celuloze iznosila je 0,5 g. Po dodatku 15 mL natrijeva citrata i natrijeva azida, tikvica s uzorkom i otopinom potopljena je u vodenu kupelj. Na kraju prije početka same hidrolize dodan je kompleks enzima (Slika 13). Promatrane vrijednosti utjecaja količine enzima na enzimatsku hidrolizu su slijedeće: 40, 60, 100, 150, 200 i 250 mL. Također, promatran je i utjecaj količine dodanog natrijeva azida kao inhibitora rasta enzima i razgradnje celuloze u rasponu kako slijedi: 0,3%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0% i 3,0%. Natrijev azid dodavan je smjesi u postotnom odnosu mase apsolutno suhog uzorka celuloze i volumena natrijeva citrata. Trajanje hidrolize iznosilo je 72 h. Za potrebe proučavanja utjecaja natrijeva azida na proces razgradnje celuloze uzimat je kontrolni uzorak svaka 24 sata te je mjerena koncentracija D-glukoze u supernatantu. Enzimatska hidroliza se odvijala u termostatisanoj kupelji s miješalicom. Temperatura procesa iznosila je 50°C pri brzini miješanja od 200 pomaka/min (Slika 14).



Slika 13. Uzorci celuloze u pripremljenoj otopini netom prije dodavanja kompleksa enzima



Slika 14. Uzorci spremni za potpuno enzimatske hidrolize u termostatisanoj kupelji s miješalicom

### 5.6. Određivanje sadržaja suhe tvari supernatanta

Sadržaj suhe tvari određen je uz pomoć ručnog refraktometra *Atago Pocket PAL-* (slika 15). Prilikom uključivanja uređaja, uređaj se anulira preko destilirane vode te prikazuje 0,00% te je spreman za daljnje analize. Netom prije analize sadržaja suhe tvari supernatanta, uzorci su homogenizirani. Za analizu se koristio volumen supernatanta od 0,3 mL odnosno potrebno je u potpunosti prekriti prizmu uređaja kako bi analiza bila uspješna. Svi rezultati prikazani su kao postotak (%) izražen prema Brixovoj skali. Mjerenje je rađeno u skladu s uputama proizvođača refraktometra.



Slika 15. Ručni refraktometar *Pocket PAL-*

## 5.7. Određivanje koncentracije D-glukoze

Koncentracija D-glukoze u supernatantu mjerila se pomoću dvije metode: 1.) ručnim glukometrom ContourNext model XT, (slika 16): inače, ovakav tip kontrolnog uređaja koristi se kod osoba koje boluju od dijabetesa a u ovom slučaju korišten je za pripremu određivanja koncentracije D-glukoze dobivene enzimatskom hidrolizom drva. Prije samog postupka određivanja koncentracije D-glukoze svaki uzorak je centrifugiran te su razdvojene tekuća i kruta faza kako nebi došlo do kontaminacije uzorka krutim ostatkom. Zatim je svaki uzorak razrijeđen destiliranom vodom kako bi ručni glukometar mogao očitati. Tako razrijeđena otopina supernatanta kapaljkom je nanesena u vidu nekoliko kapi na parafilm kako bi se formirale pravilne kapi i kako nebi došlo do kontaminacije uzorka. Vrhom listića za mjerenje koncentracije glukoze uzeto je 6 mL uzorka te se na zaslonu ručnog glukometra prikazala koncentracija glukoze u jedinici mmol/L. Kasnije je ta vrijednost prepravljena u g/L prema niže navedenom matematičkom izrazu.

$$c = \frac{c_1 \times f_p \times f_r}{1000}$$

gdje je: c- koncentracija D-glukoze (g/L),  $f_p$ - koeficijent pretvorbe koji je jednak 18,018 te  $f_r$ - koeficijent razrijeđenja otopine prije uzorkovanja.



Slika 16. Ručni glukometar s trakicom Contour XT

2.) UV spektrofotometrom *Shimadzu UV-mini 1240*: za potrebe određivanja koncentracije D-glukoze UV-spektrofotometrom koristio se pribor za određivanje D-glukoze proizvođača Sigma-Aldrich. Pribor je pogodan za određivanje razine šećera D-glukoze u prehrambenim proizvodima ali i u svim vrstama materijala. Prije samog određivanja potrebno je pripremiti reagense.

1. *glukoza oksidaza / peroksidaza reagens*

Neotvoreni reagens se pohranjuje na 2-8 °C. Svaka kapsula sadrži 500 jedinica glukoza oksidaze (*Aspergillus niger*), 100 purpurogalin jedinica peroksidaze i soli pufera. Sadržaj capsule se otapa u jantarnoj odmjernoj tikvici (slika 17) s 39,2 ml deionizirane vode. Tako pripremljen reagens stabilan je do mjesec dana na 2-8 °C i najmanje 6 mjeseci zamrznut na -20 °C.

2. *o-dianizidin reagens*

Neotvoreni reagens se pohranjuje na 2-8°C. Valja smanjiti izlaganje svjetlu na minimum. Prethodno vage na bočicu sadrži 5 mg o-dianizidin dihidroklorida. Potrebno je pomiješati sadržaj bočice s 1 ml deionizirane vode. Tako pripremljena otopina stabilna je 3 mjeseca na 2-8 °C.

3. *Reagens za ispitivanje*

U jantarnu odmjernu tikvicu koja sadrži 39,2 ml reagensa glukoza oksidaze/peroksidaze dodati 0,8 ml o-dianizidinskog reagensa. Tako pripremljena otopina je stabilna do 1 mjesec na 2-8°C.

Kada je priprema reagensa gotova slijedi priprema uzorka. Tekući uzorak potrebno je razrijediti s deioniziranom vodom na približno 20-80 mg glukoze/ml. Filtrirati ili deproteinizirati otopinu ako je potrebno dok se ne razbistri. Otkloniti boju iz otopine ukoliko je snažno obojena i koje imaju nisku koncentraciju glukoze. Potrebno je rasplinjavanje gaziranih ili fermentiranih proizvoda.

Određivanje koncentracije D-glukoze u otopini preko standardne krivulje odvija se slijedećim redoslijedom.

1. Odrediti kalibracijsku krivulju standardne otopine D-glukoze dobivene u kutiji s priborom
2. Na početku započeti reakciju uzorka dodavanjem 2 ml reagensa za ispitivanje u prvu epruvetu pritom miješajući. Pustiti 30 do 60 sekundi između dodavanja reagensa za ispitivanje na svaku sljedeću epruvetu.

3. Svaka epruveta mora reagirati to no 30 minuta na 37°C (slika 18). Zaustaviti reakciju u intervalima od 30 do 60 sekundi dodavanjem 2 ml 12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u svaku epruvetu. Potrebno temeljito promiješati svaku epruvetu.
4. Napuniti kivetu uzorkom, umetnuti u spektrofotometar, izmjeriti apsorbanciju svake epruvete u odnosu na referentnu probu na 540 nm.

Kada je odre en kalibracijski pravac, može se izraziti i njegova jednadžba pravca. Kasnije se pregledom rezultata može putem te jednadžbe utvrditi to na koncentracija D-glukoze u svakom izmjenom uzorku. Vrijednost R<sup>2</sup> kalibracijskog modela ne smije biti manja od 0,99 tj. cilj izrade kalibracijske krivulje je da se može garantirati za sve dobivene vrijednosti s sigurnoš u od 99%.



Slika 17. Glukoza oksidaza/peroksidaza reagens



Slika 18. Epruvete s uzorcima položene u termostatiranu kupelj prije analize sadržaja D-glukoze UV-spektrofotometrijskom metodom

## 6. REZULTATI S RASPRAVOM

### 6.1. Grupni kemijski sastav drva crne topolovine (*Populus nigra L.*)

Na temelju provedenih istraživanja vezanih za analizu grupnoga kemijskog sastava drva crne topolovine, dobiveni su rezultati mogu prikazati u tablici 2.

Tablica 2. Rezultati analize krugpnog kemijskog sastava drva crne topole

Broj uzorka	Pepeo (%)	EB ekstrakt <sup>A</sup> (%)	Celuloza (%)	Drvne polioze (hemiceluloza) (%)	Holoceluloza (%)	Lignin (%)
1	0,33	2,94	47,82	27,42	75,24	21,49
2	0,35	2,84	50,16	26,16	76,32	20,49
3	0,34	2,90	49,15	28,26	77,41	19,35

<sup>A</sup> ⇒ ekstrakcija smjesom otapala etanol-benzen

Op enito, dobiveni rezultati u usporedbi s rezultatima dosadašnjih istraživanja iz literature su pokazali sli nosti kod svih komponenata grupnog kemijskog sastava drva crne topole, odnosno svi rezultati su u granicama prosje nog kemijskog sastava za drvo.

### 6.2. Odre ivanje kristali nosti celuloze

Nakon odre ivanja kristali nosti ispitivane celuloze možemo zaklju iti kako udio alfa celuloze u uzorku celuloze izolirane iz drva crne topolovine (*Populus nigra L.*) iznosi 93,89%, beta celuloze 3,78% i gama celuloze 2,33%. Taj rezultat govori kako se radi o ve inski kristali noj celulozi te se taj podatak može koristiti u tuma enju rezultata u kontekstu narednih istraživanja. Slika 19 prikazuje jedan od koraka u odre ivanju koli ine alfa celuloze, titraciju.



Slika 19. Titracija filtrata u procesu odre ivanja udjela alfa celuloze



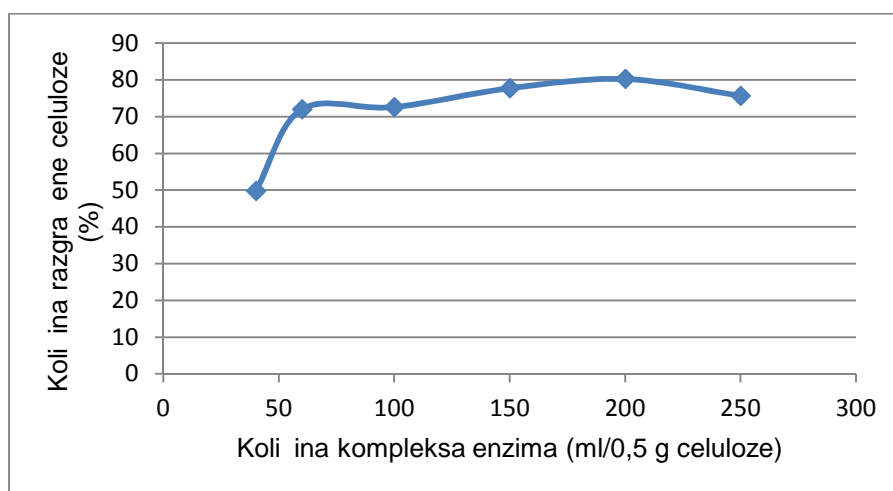
### 6.3. Proizvodi enzimatske hidrolize

Kao što je prethodno navedeno, produkti enzimatske hidrolize su D-glukoza otopljena u supernatantu te kruti ostatak koji ine ostali polisaharidi. Supernatant enzimatske hidrolize homogena je otopina prozirno žute boje i bez mirisa. Nije toksi an niti agresivan prema ovjekovim osjetilima niti prema okolišu. Upravo taj podatak enzimatsku hidrolizu predstavlja kao siguran proces kemijske prerade celuloze koja nije opasna niti po ovjekovo zdravlje niti po prirodu.

Rezultati dobivenih produkata (teku eg supernatanta i krutog ostatka) u postupku enzimatske hidrolize iskazani su u obliku kvantitativne razgradnje celuloze kako bi se prikazao realan prikaz iskorištenja celuloze iz drva crne topolovine (*Populus nigra L.*). Prilikom pripreme celuloze, potrebno je obratiti pažnju na sadržaj vode u uzorku koji ne smije izlaziti iz okvira 8-12%. Na slici 20 prikazani su dobiveni uzorci supernatanta po završetku procesa enzimatske hidrolize.

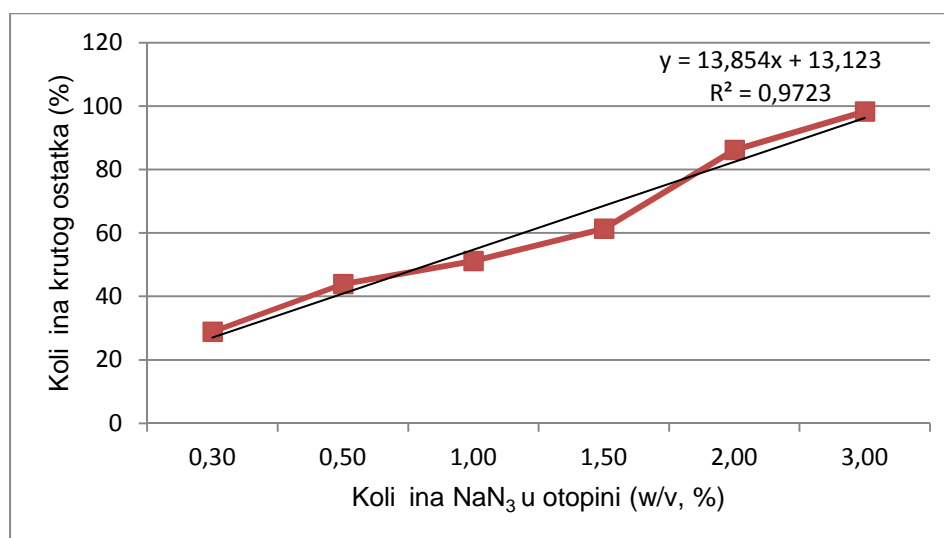


Slika 20. Nefiltrirani supernatant po završetku enzimatske hidrolize u trajanju od 72 sata



Slika 21. Kretanje koli ine razgra ene celuloze u odnosu na koli inu dodanog kompleksa enzima

Slika 21 prikazuje kretanje koli ine razgra ene celuloze u odnosu na koli inu kompleksa enzima. Na slici je vidljivo kako porastom koli ine dodanog kompleksa enzima raste i postotak razgra ene celuloze. Postotak razgra ene celuloze možemo smatrati pokazateljem uspješnosti procesa enzimatske hidrolize. Naime, pri koli ini od 200 ml kompleksa enzima u otopini vrijednost razgra ene celuloze dostiže maksimum u iznosu od 80,22%. Isto tako, može se zaključiti kako ve pri dodatku od 150 ml na pola grama apsolutno suhe celuloze, vrijednost pretvorbe prelazi granicu od 75% razgradnje. Prelazak te granice ve zna i uspješan proces.



Slika 22. Kretanje koli ine krutog ostatka u odnosu na koli inu dodanog natrijeva azida

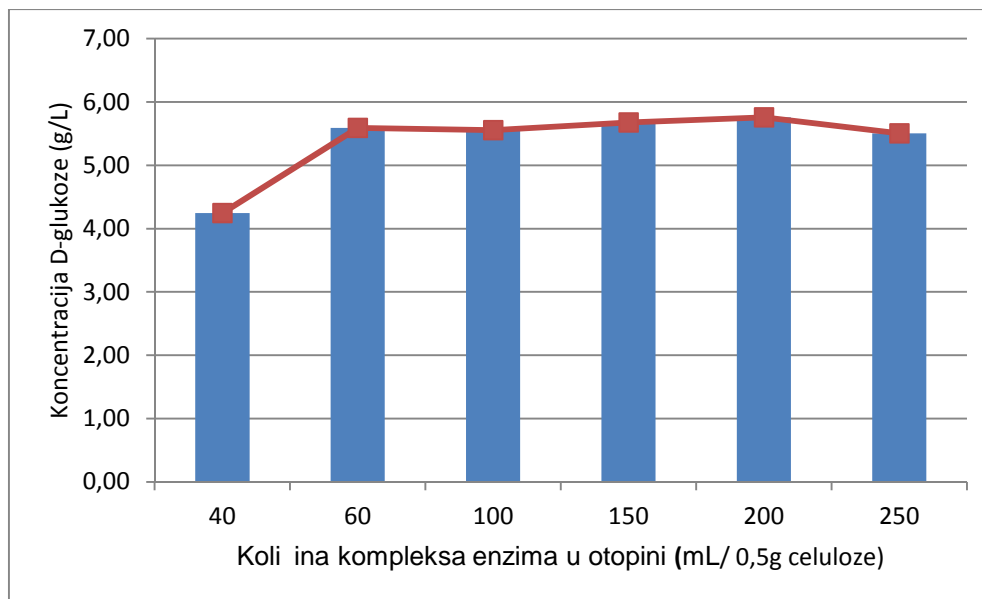
Slika 22. prikazuje kretanje koli ine krutog ostatka u odnosu na koli inu dodanog natrijeva azida. Na slici je vidljivo kako porastom koli ine dodanog natrijeva azida raste i postotak krutog ostatka. Budu i natrijev azid ima ulogu inhibitora i svojevrsnog biološkog katalizatora u samom procesu, neobi no je da porastom njegovog u eš a u otopini efikasnost enzimatske hidrolize zapravo pada. Odre ena je i vrijednost  $R^2$  pravca trenda i ona iznosi 0,972 što zna i da ovim modelom ( $y=13,85x+13,12$ ) možemo protuma iti ak 97,2% varijabilnosti u samom procesu. Na temelju slike možemo zaključiti kako natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ ) u prevelikim koli inama zaustavlja mehanizme degradacije celuloze.

## 6.4. Koncentracija D-glukoze

### 6.4.1. Odre ivanje koncentracije D-glukoze ru nim glukometrom

Po završetku enzimatske hidrolize dobiveni uzorci supernatanta podvrgnuti su odre ivanju koncentracije D-glukoze. Priru na metoda ru nim glukometrom pokazala je

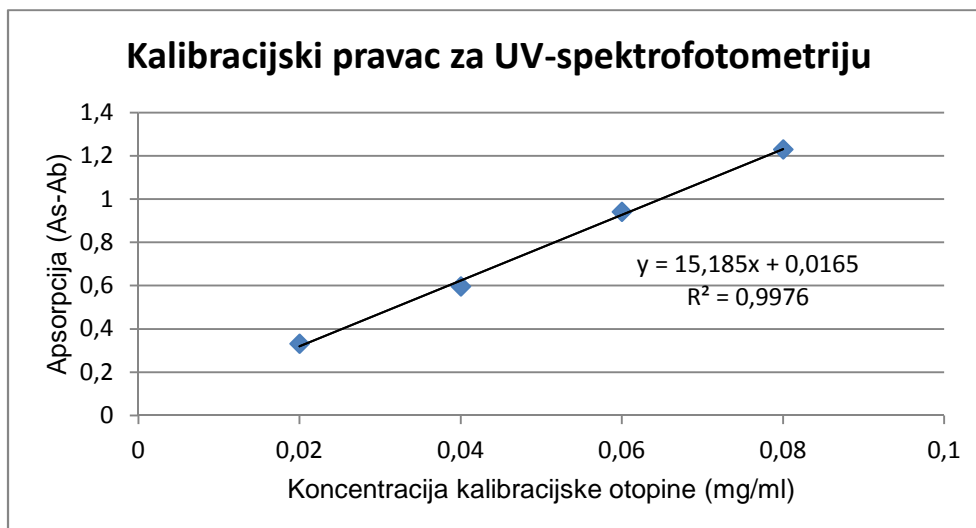
rezultate prikazane na slici 23. Na rezultatima je vidljivo kako se maksimalna koncentracija D-glukoze postiže pri dodatku od 200 mL kompleksa enzima. Pritom je vidljivo kako se približno sli na vrijednost koncentracije postiže i s 3,33 puta manjom koli inom kompleksa enzima. Takav rezultat ukazuje nam na ekonomsku optimizaciju samog procesa dobivanja D-glukoze iz celuloze drva crne topolovine (*Populus nigra L.*) jer se koriste i koli inu od 60 mL može posti i rezultat približan kao i kod 200 mL no troškovi u vidu cijene koštanja kompleksa enzima su 3,33 puta niži. Ergo, cijena koštanja cijeloga procesa se zna ajno smanjuje.



Slika 23. Odnos koncentracije D-glukoze određene ručnim glukometrom i koli ine dodanog kompleksa enzima

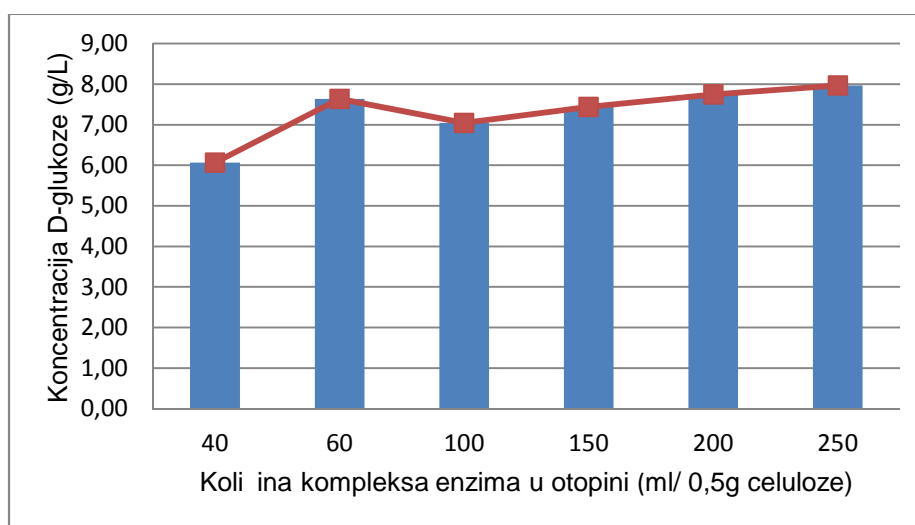
#### 6.4.2. Odre ivanje koncentracije D-glukoze UV-spektrofotometrom

Nadovezuju i se na prethodno odre ivanje koncentracije D-glukoze priru nim glukometrom, uzorci supernatanta podvrgnuti su i preciznijoj, analiti koj, metodi odre ivanja koncentracije D-glukoze, spektrofotometriji. Prije samog odre ivanja koncentracije D-glukoze, bilo je potrebno odrediti kalibracijsku krivulju prema prethodno navedenim uputama preko standardne otopine glukoze. Osim što je linearna i preko jednadžbe pravca možemo utvrditi to nu koncentraciju D-glukoze u svakom uzorku, vrijednost pravca trenda  $R^2$  nam govori kako svaki dobiveni rezultat možemo tvrditi s 99,7% sigurnoš u. Na znanstvenoj razini, ta vrijednost govori o ozbiljnosti i to nosti ispitivanih uzoraka.



Slika 24. Kalibracijski pravac za UV spektrofotometriju uzoraka ovisnim o koli ini dodanog kompleksa enzima

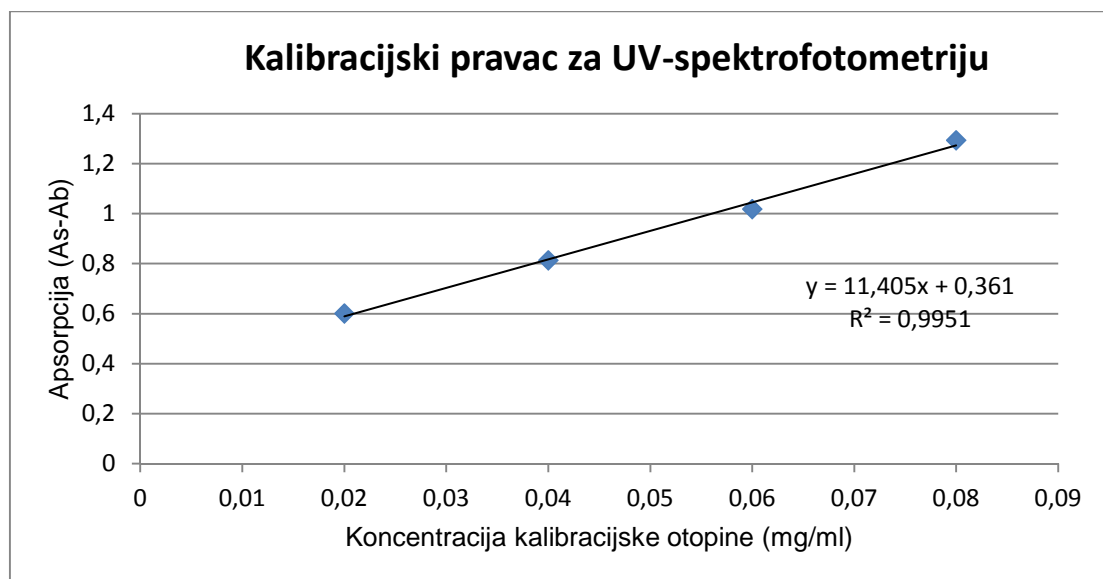
Nakon odre ivanja kalibracijske krivulje, uzorci svake dodavane koli ine kompleksa enzima podvrgnuti su po tri puta analizi UV-spektrofotometrom. Rezultati srednjih vrijednosti svake dodane koli ine kompleksa enzima prikazani su na slici 25.



Slika 25. Odnos koncentracije D-glukoze odre ene UV-spektrofotometrom i koli ine dodanog kompleksa enzima

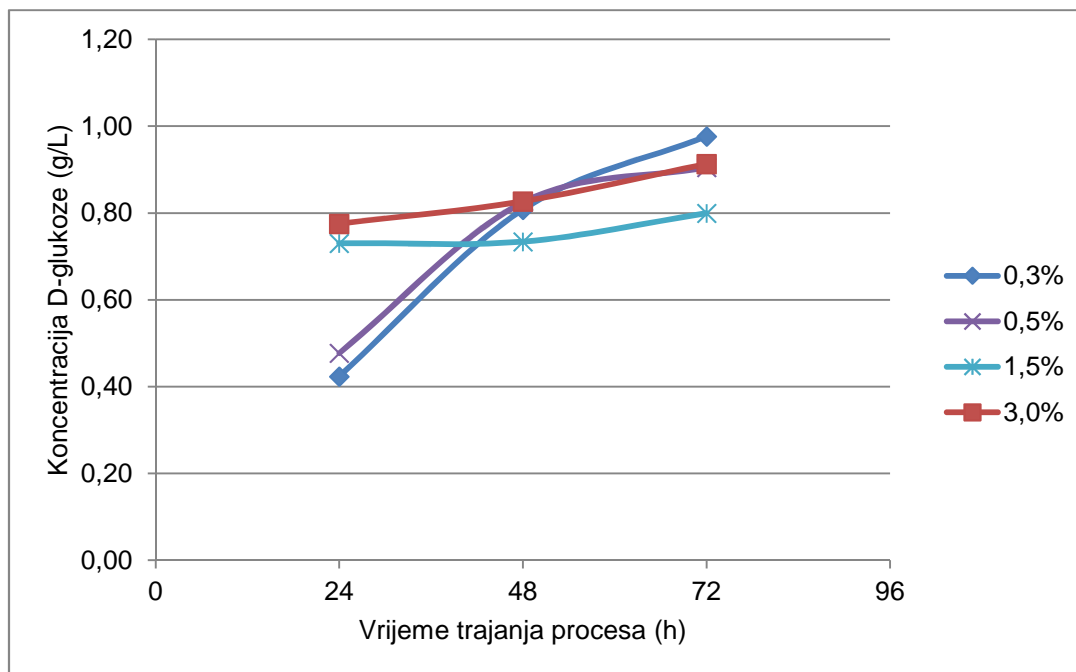
Promatraju i dobivene rezultate dobivene ru nim glukometrom i UV-spektrofotometrije možemo zaklju iti kako su rezultati dobiveni analizom na UV-spektrofotometru viših vrijednosti. S druge strane, valja uo iti kako su krivulje kretanja rezultata vrlo sli ne. To nam govori kako se ru ni glukometar može koristiti kao kontrolni ure aj u pra enju procesa no njime se ne mogu iznositi i kona ni rezultati jer odstupanja od stvarnih rezultata postoje.

Isti proces ispitivanja ponovljen je i na uzorcima kod kojih se mijenjala količina dodanog natrijeva azida u otopinu. Kalibracijska krivulja i u ovom je slučaju linearna što je prvi pokazatelj da je to određeno. Osim toga, vrijednost  $R^2$  jednadžbe kalibracijskog pravca u ovom slučaju govori kako se rezultati mogu garantirati sa sigurnošću od 99,5%. Na temelju kalibracijskog pravca i u ovom slučaju izračunate sve vrijednosti koncentracija D-glukoze u supernatantu. Na temelju ekonomske isplativosti, utjecaj udjela natrijeva azida ispitivan je na dodatku kompleksa enzima u iznosu od 60 mL. Slika 26 prikazuje dobiveni kalibracijski pravac.



Slika 26. Kalibracijski pravac za UV spektrofotometriju uzoraka ovisnim o količini dodanog natrijeva azida

Slika 27. prikazuje kretanje koncentracije D-glukoze u supernatantu kroz 72 sata. Uzorkovanje se obavljalo svaka 24 sata. Na slici je vidljivo kako za sve postotne udjele natrijeva azida vrijedi pravilo da se prolaskom vremena koncentracija D-glukoze dobivena enzimatskom hidrolizom povećava. Najznačajniji rast koncentracije D-glukoze uočen je kod minimalnog udjela natrijeva azida od 0,3% (w/v). Najmanji rast uočen je kod udjela natrijeva azida od 1,5% (w/v). Unutar 24 sata najviša koncentracija D-glukoze postigla se upravo 3,0% udjelom natrijeva azida. To govori, ukoliko se proces želi ubrzati, valja koristiti više postotne udjele natrijeva azida u otopini. S druge strane, ponovno se poteže pitanje ekonomske isplativosti i optimizacije troškova procesa. Budući da se s udjelom od 0,3% nakon 72 sata postiže viša koncentracija D-glukoze nije isplativo preporučljivo koristiti 10 puta veći udio natrijeva azida jer se time i povećavaju konačni troškovi procesa.



Slika 27. Kretanje koncentracije D-glukoze u periodima od 24 sata pod utjecajem različitih količina dodanog natrijeva azida u otopinu

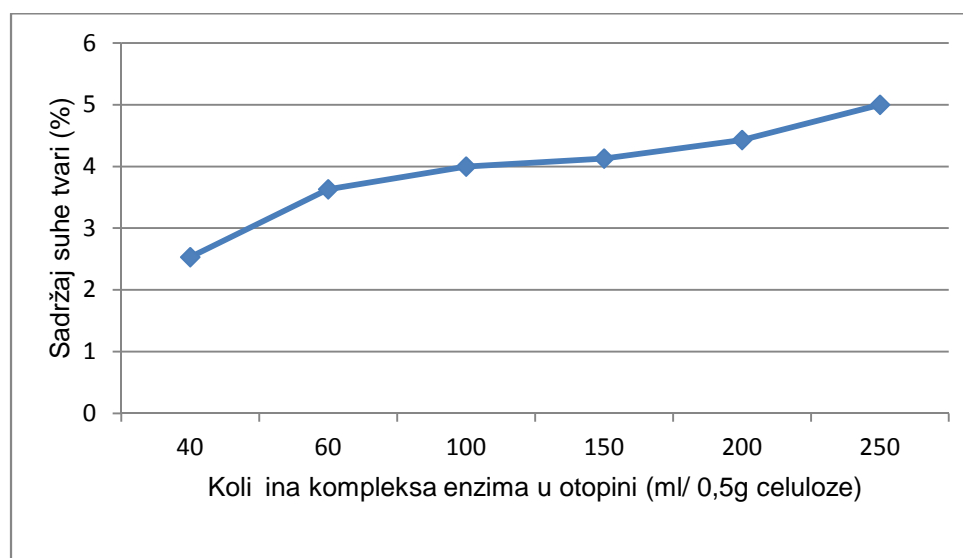
Budući da i Europska komisija već duže vrijeme razmatra i najavljuje ukidanje proizvodnje energenata iz prehrambenih kultura, valja usporediti dobivene rezultate s prethodnim znanstvenim istraživanjima na uzorcima i drva i poljoprivrednih kultura. Tako su Drissen i drugi u svom istraživanju o enzimatskoj hidrolizi pšenice (2007) dosegli maksimalnu vrijednost od 2,5 g/L glukoze. Min-Hoe i drugi su u svom istraživanju 2015. godine na rižinoj slami dosegli maksimalnu vrijednost od 10 g/L. Miazek i drugi (2017) su istraživali mogućnost izolacije D-glukoze iz bukovine (*Fagus sylvatica* L.) te su došli do zaključka kako se kroz 72 sata koncentracija D-glukoze u otopini kreće u rasponu 6-8 g/L. Kada te rezultate usporedimo s rezultatima ispitivanja supernatanta enzimatske hidrolize celuloze iz drva crne topolovine možemo zaključiti kako rezultati pšenice pokazuju niže vrijednosti koncentracije od celuloze iz crne topolovine. S druge strane, koncentracije D-glukoze iz bukovine i rižine slame pokazuju više vrijednosti od koncentracija dobivenih u ovom istraživanju. To se može protumačiti kao nedostatak korištenja drva crne topolovine u proizvodnji glukoze za energetske i prehrambene svrhe. No ipak, dvije varijable valja uzeti u obzir. Prvo, kao što je već rečeno, EU razmatra i najavljuje ukidanje pretvaranje prehrambenih kultura u energetske svrhe u koje se definitivno ubraja i rižina slama. Drugo, topolovina u odnosu na bukovinu na slobodnom tržištu postiže znatno nižu cijenu što topolovinu čini dostupnijom i ekonomski prihvatljivijom sirovinom za prerađivanje u D-glukozu.

## 6.5. Određivanje suhe tvari u supernatantu

Tablica 3. Vrijednost sadržaja suhe tvari svakog uzorka s njihovim srednjim vrijednostima

	sadržaj suhe tvari (%)					
	40 mL	60 mL	100 mL	150 mL	200 mL	250 mL
1	2,6	3,6	4,0	4,1	4,5	5,0
2	2,6	3,6	4,0	4,2	4,4	5,0
3	2,4	3,7	4,0	4,1	4,4	5,0
Srednja vrijednost	2,53	3,63	4,0	4,13	4,43	5,0

Prikazana tablica 3 ukazuje na količinu suhe tvari u supernatantu enzimatske hidrolize. Brixova skala ukazuje na količinu šećera poput fruktoze, saharoze i glukoze u otopini koja se ispituje. Brix je korištena mjera u prehrambenoj industriji. Promatrajući i srednje vrijednosti sadržaja suhe tvari u uzorcima, a u odnosu na količinu dodanog kompleksa enzima može se zaključiti kako porastom dodatka kompleksa enzima raste i sadržaj suhe tvari u postupku enzimatske hidrolize. To direktno upućuje na spoznaju kako porastom dodatka kompleksa enzima raste i količina kompleksnih šećera kao proizvoda enzimatske hidrolize. Kretanje sadržaja suhe tvari vidljivo je na slici 28. Dobiveni rezultati služe kao potvrda prethodno provedenih ispitivanja uzoraka te se poklapaju s prethodno dobivenim rezultatima.



Slika 28. Porast sadržaja suhe tvari u supernatantu u ovisnosti o dodatku kompleksa enzima

## 7. ZAKLJUČCI

Sukladno postavljenim ciljevima, planu istraživanja i rezultatima dobivenima istraživanjem iznose se sljedeći zaključci na razmišljanja:

- dobiveni rezultati određivanja krupnog kemijskog sastava u usporedbi s rezultatima dosadašnjih istraživanja iz literature su pokazali sličnosti kod svih komponenata grupnog kemijskog sastava drva crne topole, odnosno svi rezultati su u granicama prosječnog kemijskog sastava za drvo,
- za postizanje visoke koncentracije D-glukoze potrebno je da se sadržaj vode kreće u rasponu 8-12%,
- polimorfi alfa, beta i gama celuloze kreću se u otkivanim omjerima,
- porastom količine dodanog kompleksa enzima raste i količina razgrađene celuloze,
- porastom količine dodatka natrijeva azida ( $\text{NaN}_3$ ) pada količina razgrađene celuloze,
- ekonomski opravdana optimalna količina enzima iznosi 60 mL jer se pri toj vrijednosti dostiže vrijednost koncentracije D-glukoze približna maksimalnoj postignutoj vrijednosti,
- iako ni glukometar i UV-spektrofotometar iako prikazuju različite koncentracije, prikazuju gotovo identične krivulje kretanja koncentracije u ovisnosti o dodatku kompleksa enzima. Stoga, jedno od narednih istraživanja bi trebalo usporediti točnost i preciznost tih dviju analiza jer se i s tehnološke strane kod analize koncentracije u proizvodnji mogu smanjiti troškovi,
- porastom postotnog dodatka natrijeva azida ( $\text{NaN}_3$ ) smanjuje se koeficijent rasta koncentracije u periodima od 24 sata. Ekonomski je koristiti količinu od 0,3% (w/v) iako se sporije dolazi do maksimalne koncentracije, po završetku hidrolize od 72 sata upravo 0,3% doseže maksimalnu vrijednost,
- porastom količine kompleksa enzima u otopini raste i sadržaj suhe tvari što direktno upućuje na porast količine šećera u otopini i potvrđuje pretpostavku da više enzima u istom vremenskom periodu razgradi više celuloze.



## 8. ZAHVALE

Zahvaljujemo se mentorima izv. prof. dr. sc. Alanu Antonovi u te doc. dr. sc. Nikoli Špani u na pruženoj prilici za suradnju, neizmjerne potpore našem stručnom i znanstvenom usavršavanju, neizmjerne količini strpljenja i volje u najtežim trenucima tokom izvođenja istraživanja te nesebičnoj pomoći i mnogim dragocjenim savjetima.

Zahvaljujemo se i cijelom Zavodu za tehnologije materijala Šumarskog fakulteta u Zagrebu koji nam je omogućio provedbu ovih istraživanja.

Ovaj rad posvećujemo našim obiteljima i najbližima. Posebne zahvale upućujemo Mariji i Zrinki. Bez njihove podrške, ovo znanstveno istraživanje bilo bi mnogo teže.

Juraj Stanešić, bacc.ing.techn.lign.

Tomislav Podvorec, bacc.ing.techn.lign

## 9. POPIS LITERATURE

Antonovi , A. 2007: Kemija drva, Skripta, Šumarski Fakultet

Christersson, L. L.; Zsuffa L. The role and significance of woody biomass plantations in Swedish agriculture, 1993., The Forestry Chronicle Vol. 69

Drissen, R.E.T.; Maas, R.H.W.; Van Der Maarel, M.; Kabel, M.A.; Schols, H.A.; Tramper, J.; Beeftink, H.H., 2007: A generic model for glucose production from various cellulose sources by a commercial cellulase complex

Europski parlament i Vijeće, 2009.: Direktiva 2009/28/EZ o promicanju uporabe energije iz obnovljivih izvora te o izmjeni i kasnijem stavljanju izvan snage direktiva 2001/77/EZ i 2003/30/EZ

Fengel, D.; Wegener, G., 1989: Wood-Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Verlag Kessel, Remagen, Germany

Galbe, M.; Zacchi, G. 2002: A review of the production of ethanol from softwood. Applied Microbiology and Biotechnology Vol.59, No.6, (July, 2002), pp. 618-628

Iranmahboob, J.; Nadim, F.; Monemi, S. 2002: Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. Biomass and Bioenergy, Vol.22, No.5, (May, 2002), pp.401-404.

Lenihan, P.; Orozco, A.; O'Neil, E.; Ahmad, M., N., M.; Rooney, D., W.; Walker G., M. 2010: Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. Chemical Engineering Journal, Vol. 156, No.2, (January, 2010), pp. 395-403

Li, X.; Converse, A. O.; Wyman, C.E., 2003: Characterization of the molecular weight distribution of oligomers from uncatalyzed batch hydrolysis of xylan, Appl. Biochem. Biotechnol.

Miazek, K.; Remacle, C.; Richel, A.; Goffin, D., 2017: Effect of Enzymatic Beech *Fagus Sylvatica* Wood Hydrolysate on *Chlorella* Biomass, Fatty Acid and Pigment Production.

Min-Ho, J.; Ji-Youn, K.; Sangyong, K.; Dong-Ho, K.; Suk, B.; Hyun, P.; Sung Gu, L.; Se Jong, H.; Jong-il, C., 2015: Microalgal lipid production using the hydrolysates of rice straw pretreated with gamma irradiation and alkali solution, *Biotechnol Biofuels* 8:125,

Morales-delaRosa, S.; Campos-Martin, J. M.; Fierro, J. L. G., 2014: Optimization of the process of chemical hydrolysis of cellulose to glucose.

Rowell, R. M.; Pattersen, R.; Han, J. S.; Rowell, J. S.; Tshabalala, M. A. 2005: Cell Wall Chemistry. In: „Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites“. Rowell, R. M. (ed.), CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 37-52

Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D., 2005: Determination of ash in biomass. Laboratory analytical procedure. National renewable energy laboratory. 1-5.

Sluiter, A.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D., 2005: Determination of extractives in biomass. Laboratory analytical procedure. National renewable energy laboratory. 1-12.

Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D.; 2008: Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure. National renewable energy laboratory. 1-16.

Špani, N. 2014: Karakterizacija biokompozitnih drvenih materijala pripremljenih sintetiziranjem acetilirane celuloze i celuloznih polimorfa. Doktorski rad, Šumarski fakultet, Zagreb

Taherzadeh, M. J.; Karimi, K., 2007: Bioethanol review. *Bio Resources* 2(3), 472-499

Taherzadeh, M. J.; Karimi, K., 2007: Enzyme-based ethanol, *BioResources* 2(4), 707-738

Verardi, A.; De Bari, I.; Ricca, E.; Calabrò, V.; 2012: Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives, *Bioethanol*, Prof. Marco Aurelio Pinheiro Lima (Ed.), ISBN: 978-953-51-0008-9

Wyman, C. E.; Decker, S. R.; Brady, J. W.; Viikari, L.; Himmel, M. E. 2005: Hydrolysis of cellulose and hemicellulose

Wyman, C. E., 2001: 20 years of trials, tribulations, and research progress on bioethanol technology: Selected key events along the way, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 91-93:5

Torget, R.; Himmel, M.; Grohmann, K., 1992., Dilute-acid pretreatment of two short-rotation herbaceous crops, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 34/35:115

TAPPI T257 cm-02- Uzorkovanje i priprema drva za analize; Sampling and preparing wood for analysis

TAPPI T203 cm-99 – Određivanje alfa, beta i gama celuloze

<http://www.plantea.com.hr/crna-topola>

## 10. SAŽETAK

JURAJ STANEŠI I TOMISLAV PODVOREC

### UTJECAJ KOLI INE KOMPLEKSA ENZIMA I NATRIJEVA AZIDA ( $\text{NaN}_3$ ) NA PROCES I PROIZVODE ENZIMATSKE HIDROLIZE CELULOZE IZ DRVA CRNE TOPOLE (*Populus nigra L.*)

Značajan porast potrošnje neobnovljivih izvora energije (nafta, ugljen i prirodni plin) zbog ubrzanog razvoja svjetskog gospodarstva uzrokuje brže iscrpljivanje njihovih zaliha i povećanje emisije stakleničkih plinova. Prednost drvene biomase u usporedbi s fosilnim gorivima je negativna bilanca emisije  $\text{CO}_2$  prilikom njenog iskorištenja tj. prerade. Bioetanol proizveden iz obnovljive lignocelulozne sirovine mogao bi dovesti do smanjenja emisije plinova koji izazivaju efekt staklenika, ali i energetske krize izazvane ograničenim rezervama fosilnih goriva. U procesu proizvodnje bioetanola najvažniji korak je izolacija šećera, to nije glukoze iz lignocelulozne biomase. Stoga, ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi grupni kemijski sastav drva crne topolovine (*Populus nigra L.*), količinu razgradnje celuloze u ovisnosti o ulaznim količinama kompleksa enzima celulaze i natrijeva azida ( $\text{NaN}_3$ ). Nadalje, ciljevi rada su odrediti i koncentraciju otopljene D-glukoze u ovisnosti o ulaznoj količini kompleksa enzima celulaze kao i kretanje koncentracije otopljene D-glukoze u ovisnosti o ulaznoj količini natrijeva azida ( $\text{NaN}_3$ ) u jednakim vremenskim intervalima od 24 sata. U konačnici, cilj istraživanja je određivanje sadržaja suhe tvari otopine. Za enzimatsku hidrolizu korišten je kompleks enzima Cellic Ctec2. Također, za određivanje koncentracije D-glukoze korištene su dvije metode. Koncentracija je određivana rukom glukometrom i analizom na UV-spektrofotometru. Rezultati istraživanja pokazali su kako se porastom količine enzima raste stupanj razgradnje celuloze, raste koncentracija D-glukoze u otopini i raste sadržaj suhe tvari u otopini. S druge strane istraživanje je pokazalo kako dodatkom natrijeva azida ( $\text{NaN}_3$ ) raste količina suhog ostatka po završetku hidrolize. Također, aktivnost enzima je intenzivnija s većim dodatkom natrijeva azida ali se konačne koncentracije značajno ne razlikuju. Metodologija utvrđena ovim istraživanjem koristit će se u daljnjim istraživanjima.

**Ključne riječi:** crna topola (*Populus nigra L.*), grupni kemijski sastav, enzimatska hidroliza, D-glukoza, UV-spektrofotometrija

## 11. SUMMARY

JURAJ STANEŠI I TOMISLAV PODVOREC

### INFLUENCE OF ENZYME COMPLEX AND AZIDIC COMPOUND (NaN<sub>3</sub>) QUANTITY ON THE PROCESS AND PRODUCTS OF ENZYMATIC HIDROLYSIS OF CELLULOSE FROM BLACK POPLAR WOOD (*Populus nigra* L.)

Significant increases in the consumption of non-renewable energy sources (oil, coal and natural gas) due to the accelerated development of the world economy cause faster depletion of their supplies and increase of greenhouse gas emissions. The advantage of wood biomass compared to fossil fuels is the negative balance of CO<sub>2</sub> emissions when it is used or processed. Bioethanol produced from renewable lignocellulosic raw materials could lead to a reduction of greenhouse gas emissions, but also the energy crisis caused by limited reserves of fossil fuels. In the bioethanol production process, the most important step is sugar isolation, namely glucose from lignocelulose biomass. Therefore, the objectives of this study were to determine the group chemical composition of black poplar wood (*Populus nigra* L.), the quantity of degraded cellulose depending on the input quantities of the complexes of cellulase and sodium azide (NaN<sub>3</sub>). Furthermore, the objectives of the study are to determine the concentration of dissolved D-glucose depending on the input volume of the cellular enzyme complex as well as the movement of the dissolved D-glucose concentration in dependence of the intake of sodium azide (NaN<sub>3</sub>) at equal time intervals of 24 hours. Ultimately, the aim of the study is to determine the content of the dry substance of the solution. Cellic Ctec2 enzyme complex was used for enzymatic hydrolysis. Also, two methods were used to determine the concentration of D-glucose. Concentration was determined by manual glucose and by analysis on the UV spectrophotometer. The results of the study showed that with the increasing of enzymes levels are increasing the level of cellulose degradation, the concentration of D-glucose and the dry substance content in the solution increases. On the other hand, the study showed that with the addition of sodium azide (NaN<sub>3</sub>) increases the amount of dry residue upon completion of hydrolysis. Also, the enzyme activity is more intense with higher sodium azide addition but the final concentrations do not differ significantly. The methodology established by this study will be used in further research.

**Key Words:** black poplar wood (*Populus nigra* L.), group chemical composition, enzymatic hidrolisis, D-glucose, UV spectrophotometry