

Utjecaj različitih kemijskih metoda predobrade drva crne topolovine (*Populus nigra* L.) na proces i proizvode enzimatske hidrolize

Stanešić, Juraj

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Forestry / Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:108:486902>

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

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



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology](#)



ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
DRVNOTEHNOLOŠKI ODSJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
DRVNOTEHNOLOŠKI PROCESI

JURAJ STANEŠIĆ

UTJECAJ RAZLIČITIH KEMIJSKIH METODA PREDOBRADE DRVA
CRNE TOPOLOVINE (*Populus nigra* L.) NA PROCES I PROIZVODE
ENZIMATSKE HIDROLIZE

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2018.

ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
DRVNOTEHNOLOŠKI ODSJEK

**UTJECAJ RAZLIČITIH KEMIJSKIH METODA PREDOBRADE DRVA
CRNE TOPOLOVINE (*Populus nigra* L.) NA PROCES I PROIZVODE
ENZIMATSKE HIDROLIZE**

DIPLOMSKI RAD

Diplomski studij: Drvnotehnološki procesi

Predmet: Tehnologija drvnih vlakana i papira

Ispitno povjerenstvo: 1. izv. prof. dr. sc. Alan Antonović

2. prof. dr. sc. Vladimir Jambreković

3. doc. dr. sc. Nikola Španić

Student: Juraj Stanešić, univ.bacc.ing.techn.lign.

JMBAG: 0068221233

Broj indeksa: 785/16

Datum odobrenja teme: 20.04.2018.

Datum predaje rada: 24.08.2018.

Datum obrane rada: 07.09.2018.

Zagreb, rujan 2018.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Naslov	Utjecaj različitih kemijskih metoda predobrade drva crne topolovine (<i>Populus nigra</i> L.) na process i proizvode enzimatske hidrolize
Title	The impact of different chemical pretreatment methods of black poplar wood (<i>Populus nigra</i> L.) on the process and products of enzymatic hidrolisis
Autor	Juraj Stanešić, univ.bacc.ing.techn.lign.
Adresa autora	Golubovečka 13
Mjesto izrade	Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Vrsta objave	Diplomski rad
Mentor	izv. prof. dr. sc. Alan Antonović
Izradu rada pomogao	doc. dr. sc. Nikola Španić
Godina objave	2018.
Obujam	43 stranice, 10 tablica, 26 slika i 32 navoda literature
Ključne riječi	crna topola (<i>Populus nigra</i> L.), enzimatska hidroliza, D-glukoza, lignin, UV-spektrofotometrija
Key words	black poplar wood (<i>Populus nigra</i> L.), enzymatic hidrolisis, D-glucose, lignin, UV spectrophotometry
Sažetak	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 ima osobito veliki potencijal u proizvodnji energije iz drvne biomase, jer je oko 50 % kopnenog teritorija pokriveno šumama. Prema nekim procjenama od šumarske djelatnosti u Hrvatskoj moguće je pridobiti oko 2 043 000 m³ biomase godišnje za energetske i ostale potrebe. Enzimatska hidroliza svakako je jedan od procesa kemijske prerade drva u svrhu dobivanja proizvoda visoke dodane vrijednosti. 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. 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 proces prerade bio što učinkovitiji i financijski maksimalno isplativ potrebno je poznavati sustav predtretiranja same drvne biomase kako bi se stigao.

Izjavljujem da je moj diplomski rad izvorni rezultat mogega rada te da se u izradi istoga nisam koristio drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni.

Juraj Stanešić

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. KEMIJSKI SASTAV DRVA.....	4
2.1. Mineralne tvari.....	5
2.2. Akcesorne tvari (ekstraktivne tvari).....	6
2.3. Lignin	7
2.4. Celuloza	9
2.4.1. Polimorfi celuloze.....	11
2.5. Hemiceluloza (drvne polioze).....	12
3. ENZIMATSKA HIDROLIZA DRVA	14
3.1. Glukoza.....	16
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
5.3.1. Određivanje sadržaja pepela (P).....	21
5.3.2. Određivanje sadržaja akcesornih tvari (AT)	21
5.3.3. Određivanje sadržaja lignina (L)	22
5.3.4. Određivanje sadržaja holoceluloze (HC)	22
5.3.5. Određivanje sadržaja celuloze (C).....	23
5.3.6. Određivanje sadržaja drvnih polioza (DP) – hemiceluloze.....	23
5.4. Određivanje sadržaja lignina acetil-bromidnom metodom	23
5.5. Izbijeljivanje drvnih vlakana	24

5.6. Enzimatska hidroliza	25
5.7. Određivanje sadržaja suhe tvari supernatanta.....	26
5.8. Određivanje koncentracije D-glukoze.....	27
6. REZULTATI S RASPRAVOM.....	29
6.1. Grupni kemijski sastav drva crne topolovine (<i>Populus nigra L.</i>).....	29
6.2. Sadržaj lignina određen acetil-bromidnom metodom	30
6.3. Proces i proizvodi enzimatske hidrolize	31
6.3.1. Određivanje koncentracije D-glukoze	31
6.3.2. Određivanje mase izolirane D-glukoze.....	34
6.3.3. Utjecaj pH otopine na proizvode enzimatske hidrolize	36
6.3.4. Utjecaj prisutnosti lignina na proizvode enzimatske hidrolize	37
6.3.5. Određivanje suhe tvari u supernatantu.....	38
7. ZAKLJUČAK	40
LITERATURA.....	41

POPIS SLIKA

Slika 1. Grupni kemijski sastav drva prema

Slika 2. Prosječni kemijski sastav četinjača i listača

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

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

Slika 5. Kemijska formula glukoze i celuloznog lanca

Slika 6. Stereo-kemijska formula celuloze

Slika 7. Meyer-Mischov model kristalne jedinice celuloze I

Slika 8. Formule šećernih komponenata polioza

Slika 9. Prikaz kemijskog procesa pretvorbe celuloze u glukozu

Slika 10. Prikaz α i β izomera glukoze

Slika 11. Produkcija biomase nekih šumskih vrsta drveća

Slika 12. Shematski prikaz metoda izolacije glavnih komponenata drva

Slika 13. Prikaz Soxhletove aparature za izolaciju ekstraktivnih tvari

Slika 14. Reakcijske smjese drvnih vlakana i otapala

Slika 15. Uzorci spremni za početak enzimatske hidrolize u termostatiranoj kupelji s miješalicom

Slika 16. Ručni refraktometar *Pocket PAL- α*

Slika 17. Prikaz odnosa sadržaja vode i sadržaja akcesornih tvari u uzorku

Slika 18. Sadržaj lignina u ovisnosti o vrsti otapala

Slika 19. Kalibracijski pravac za UV-spektrofotometrijsku analizu uzoraka hidrolize ovisnim o vrsti otapala za predobradu ulazne sirovine

Slika 20. Kretanje koncentracije glukoze u supernatantu u ovisnosti o vrsti otapala

Slika 21. Ovisnost postotno izolirane glukoze o vrsti otapala

Slika 22. Ovisnost količine izolirane D-glukoze (%) i koncentracije D-glukoze u otopini (g/L)

Slika 23. Ovisnost krutog ostatka o pH vrijednosti otopine

Slika 24. Odnos koncentracije D-glukoze u supernatantu i količine lignina u uzorku

Slika 25. Utjecaj količine lignina u uzorcima na količinu izolirane D-glukoze

Slika 26. Ovisnost količine suhe tvari u supernatantu o metodi predobrade uzoraka

POPIS TABLICA

Tablica 1. Prikaz prijedloga Američke agencije za zaštitu okoliša za 2019. godinu

Tablica 2. Uzorci drva crne topolovine

Tablica 3. Rezultati analize sadržaja ekstraktivnih tvari različitim metodama izolacije

Tablica 4. Rezultati određivanja sadržaja celuloze, holoceluloze i Klasonova lignina

Tablica 5. Rezultati prinosa izbijeđenih drvnih vlakana modificiranom Franklinovom metodom

Tablica 6. Rezultati količine lignina dobiveni acetil-bromidnom metodom

Tablica 7. Prikaz rezultata koncentracije D-glukoze dobivenih UV-spektrofotometrijom

Tablica 8. Vrijednosti masa D-glukoze dobivene enzimatskom hidrolizom u gramima (g)

Tablica 9. Vrijednosti masa D-glukoze dobivene enzimatskom hidrolizom izražene u postotcima (%)

Tablica 10. Rezultati određivanja suhe tvari u supernatantu

1. UVOD

Stalni rast svjetske populacije kao i sve veća industrijalizacija, motorizacija i urbanizacija čine da potrebe čovječanstva za energijom konstantno rastu. Danas se više od 80% svjetske potrebe za energijom osigurava sagorijevanjem 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 tvari biljnog i životinjskog podrijetla), šumarstva i s njima povezanih proizvodnih djelatnosti uključujući ribarstvo i akvakulturu te biorazgradiv udio industrijskog i komunalnog otpada. Sa stajališta šumarske struke biomasa je drvena tvar i čini ju drvena masa dobivena uzgojnim zahvatima kao što su čišćenja i prorede ili kao ostatak od sječe (granjevina, ogrjevno drvo). Drvenu tvar ili lignocelulozu proizvode samo žive biljke. U srednjoj geološkoj prošlosti Zemlje (mezozoik-karbon) glavni proizvođač drvene tvari bilo su niže vaskularne biljke iz skupine papratnjača (*Pteridophytae*), dok danas drvenu tvar od praktičnog značenja proizvodi samo više vaskularne biljke iz skupine sjemenjača, odnosno golosjemenjače (četinjače) i kritosjemenjače (listače). Prednost drvene biomase u usporedbi s fosilnim gorivima je negativna bilanca emisije CO₂ prilikom njenog iskorištenja tj. prerade. Time se želi reći da drvo u sebi apsorbira više ugljikovog dioksida no 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.

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. Prema nekim procjenama od šumarske djelatnosti u Hrvatskoj moguće je pridobiti oko 2 043 000 m³ biomase godišnje za energetske i ostale potrebe. U navedenu biomasu uključeni su ostaci od sječa (sitna granjevina), ostaci od prerade drveta, prostorno drvo, otpad i gubici pri

sječama, te biomasa s opožarenih površina i degradiranih šuma. Lundmark i suradnici (2018) sa Sveučilišta Luleå u Švedskoj napravili su istraživanje o implementaciji biorafinerija u švedsko gospodarstvo. Došli su do sedam zaključaka od kojih valja izdvojiti sljedeće: 1. povećana proizvodnja biogoriva ne utječe na trenutnu proizvodnju proizvoda od drva, 2. povećana potražnja za biogorivima proširit će i izvor sirovina, 3. generalno, povećanje proizvodnje biogoriva može imati samo ograničen utjecaj na cijenu drvene sirovine, 4. postizanje proizvodnje biogoriva velikog kapaciteta može se ostvariti korištenjem i razvijanjem novih tehnologija.

Američka agencija za zaštitu okoliša (U.S. EPA) je u lipnju ove godine predložila ciljanu količinu proizvodnje za 2019. Tablica 1. prikazuje kako bi SAD u 2019. godini proizvodnju s 1,09 milijarde litara celuloznih biogoriva trebale podići za gotovo 33% i doseći nevjerojatnih 1,44 milijarde litara celuloznog biogoriva. Za biodizel nije povećana kvota proizvodnje jer je u 2017. godini ustanovljen dvogodišnji plan proizvodnje biodizela. Proizvodnja naprednih biogoriva novim prijedlogom bi dosegla rast od 14% i iznosila bi 18,47 milijardi litara godišnje. Također je predviđen porast proizvodnje obnovljivih goriva s 73,02 na 75,25 milijardi litara godišnje. Ovim prijedlogom najviše se podiže proizvodnja celuloznih biogoriva. Upravo iz tog razloga valja istraživati naprednu kemijsku preradu drvene biomase.

Tablica 1. Prikaz prijedloga Američke agencije za zaštitu okoliša za 2019. godinu (izvor: <http://biomassmagazine.com/articles/15533>)

	2018.	2019.
Celulozna biogoriva (mlrd. litara)	1,09	1,44
Dizel na bazi biomase (mlrd. litara)	7,95	7,95
Napredna biogoriva (mlrd. litara)	16,24	18,47
Obnovljiva goriva (mlrd. litara)	73,02	75,25

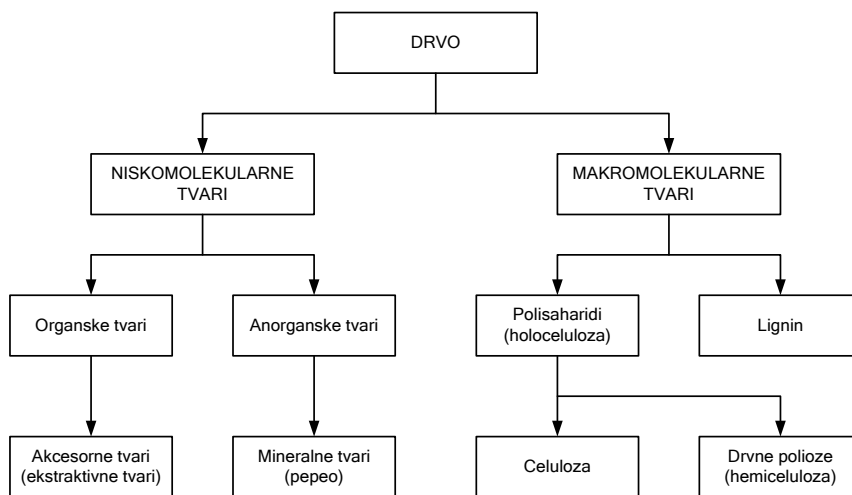
Biomasa šumskih vrsta drveća može se proizvoditi i intenzivnim uzgajanjem brzorastućih vrsta drveća kao što su: vrbe, topole, joha, breza, bagrem, paulovnja, eukaliptusi i dr. Ovakav način proizvodnje biomase šumskih vrsta poznat je pod nazivima kulture kratkih ophodnji ili intenzivne kulture kratkih ophodnji. Kulture kratkih ophodnji je termin koji

obuhvaća šumarsku djelatnost kao specifični način uzgajanja drveća u pravilnom rasporedu na kultiviranom tlu, sličniji uzgajanju poljoprivrednih kultura nego klasičnom šumarstvu. Takve plantaže brzorastućeg drveća nazivaju se i energetske nasadi ili energetske plantaže. Razlozi uporabe brzorastućih vrsta šumskog drveća leže u njihovim biološkim svojstvima tj. vrlo bujnim prirastom u prvim godinama života, sposobnosti vegetativnog razmnožavanja, sposobnosti uspijevanja na marginalnim staništima, tolerancije na gušći sklop itd. 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 potencijalnih procesa kemijske prerade drva u svrhu dobivanja proizvoda visoke dodane vrijednosti. Međutim, složena struktura lignocelulozne sirovine predstavlja izvor mnogobrojnih problema u pretvorbi bioetanola. 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 biorafinacijama za proizvodnju goriva visoke energetske vrijednosti i u proizvodnji kemikalija. Dodavši tome, glukoza se može degradirati i dehidrirati kako bi se dobio 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF), koji se kasnijom dekompozicijom može pretvoriti u levulinsku ili mravlju kiselinu u tekućem mediju.

Osiguravanje odgovarajuće interakcije između celuloze i celulaza, enzimatskog kompleksa koji je razgrađuje, je od ključnog značaja za efikasnost enzimatske hidrolize, a samim tim i za održivost i ekonomsku isplativost cjelokupne proizvodnje bioetanola. 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 proces prerade bio što učinkovitiji i financijski maksimalno isplativ potrebno je poznavati sustav predobrade same drvene biomase kako bi se postigao maksimalni prinos glukoze kao šećerne komponente koja kasnije fermentira u bioetanol.

2. KEMIJSKI SASTAV DRVA

Drvne su stanice kemijski heterogene ili raznovrsne i tvore polimernu mrežu strukturnih komponenata: ugljikohidrate, uglavnom su to polisaharidi celuloza i hemiceluloza (drvne polioze), i lignin. Te makromolekularne tvari nisu jednolično raspoređene unutar stanične stijenke drva, te njihova relativna koncentracija varira između različitih 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 stanične stijenke, te su općenito više vezane za određene vrste drva (Fengel i Wegener, 1989) (slika 1). Općeniti kemijski sastav drva razlikuje se unutar pojedinih dijelova stabla. Također je poznato da postoje razlike u kemijskom sastavu drva unutar istog stabla, pogotovo u radijalnom smjeru, kao i između normalnoga i reakcijskog drva. Drvo je, kao i svi lignocelulozni materijali, kompleks različitih kemijskih tvari. Pojam "kompleks" znači da nije poznato kako su pojedine tvari drva međusobno povezane u staničnim stijenkama te jesu li te veze kemijske (kovalentne veze) ili fizikalne (molekularne veze) prirode (Fengel i Wegener, 2003).

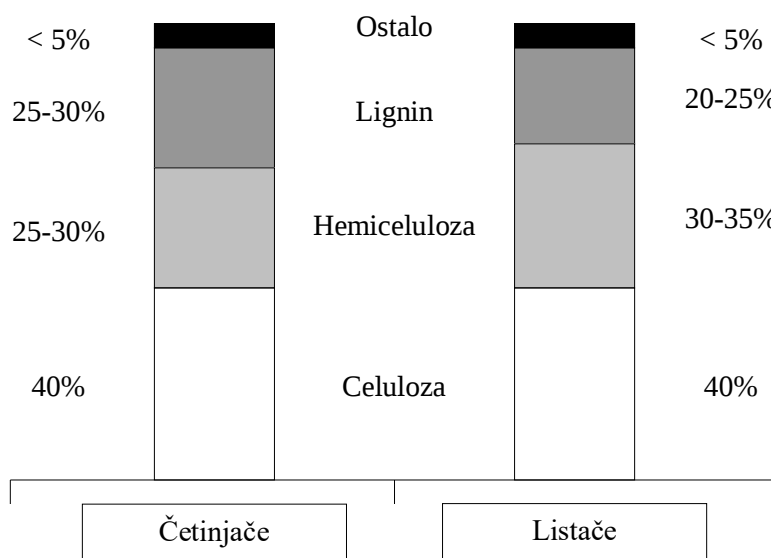


Slika 1. Grupni kemijski sastav drva prema Fengelu i Wegeneru (1989)

Poznato je da se rast stabla odvija pod kontrolom reakcije fotosinteze, koja uključuje reakcije proizvodeći različite ugljikohidrate iz ugljikovog dioksida i vode uz prisutnost klorofila i Sunčevog svjetla. To znači da je elementarni sastav drva sastavljen iz elemenata ugljika (C), vodika (H) i kisika (O), a apsolutna suha tvar raznih vrsta drva (sušeno pri $103\pm 2^{\circ}\text{C}$ 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%).

Prihvaćeno je da su dvije trećine suhe tvari drva sastavljene od polisaharida (celuloze i različitih hemiceluloza). Međutim, kada se proučava detaljnije, vidimo da se četinjače i listače međusobno razlikuju na osnovu njihovih kemijskih sastava. U oba slučaja, sadržaj celuloze je više ili manje isti (40-45% na apsolutno suhu tvar), ali četinjače u pravilu sadrže manje hemiceluloze a više lignina. Sadržaj hemiceluloze u četinjačama je između 25-30%, a kod listača 30-35% gledano na apsolutno suhu tvar. Sadržaj lignina četinjača se uglavnom kreće od 25-30%, dok se sadržaj lignina u listačama iz umjerenih zona kreće 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 (Antonović, 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 četinjačama i listačama, 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 četinjača i listača

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 između 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 između 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 K₂O, magnezija 5-10% i aluminijska, željeza i natrija od 1-2%.

2.2. Akcesorne tvari (ekstraktivne tvari)

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 (uključujući smolne kiseline i steroide), esteri masnih kiselina (masti i voskovi), masne kiseline i alkoholi, i alkani; Fenolne spojeve - jednostavni fenoli, stilbeni, lignani, izoflavoni i izoflavonoidi, kondenzirajući tanini, hidrolizirajući tanini i flavonoidi; Ostale spojeve – šećeri, ciklotoli, tropoloni, amino kiseline, alkaloidi, kumarini i kinoni.

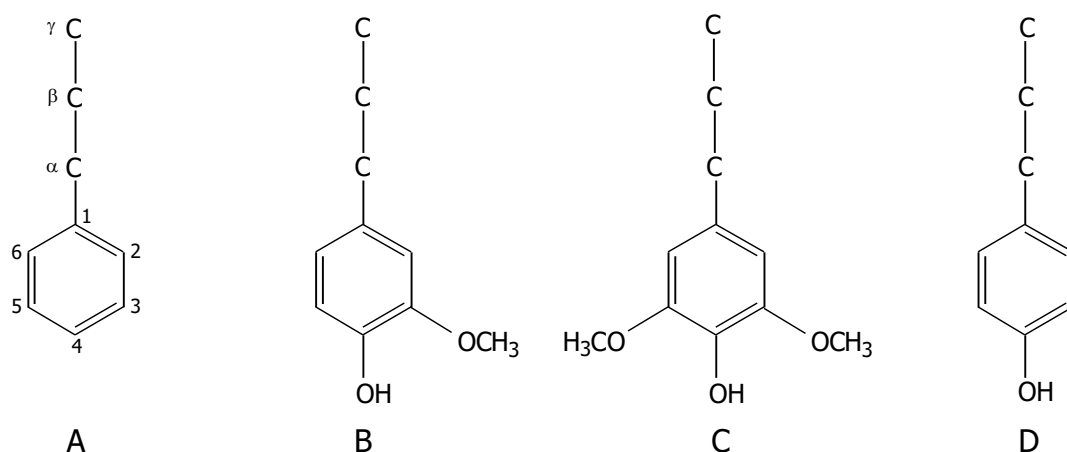
2.3. Lignin

Lignin je treća velika komponenta stanične stijenke drva (20-40%). Smješten je u staničnoj stijenci i srednjoj lameli kao obložna tvar, slijedeći tvorbu polisaharida, a služi kao cement između drvnih vlakana, kao sredstvo ukrućivanja 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 staničja viših biljaka, gdje izgrađuje provodno staničje 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 zarašćivanja 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 učestalošću i rasprostranjenosti različitih veza. Ova slučajna struktura nastaje iz enzimatsko iniciranog slobodnog radikala polimerizacije ligninskih prethodnika u p-hidroksicinamil alkoholne oblike. U četinjačama (koniferima), gvajacilni lignin stvara se iz koniferilnog alkohola (3-metoksi-4-hidroksi-cinamil alkohol), a u listačama, gvajacil-siringilni lignini stvaraju se iz koniferilnog alkohola i sinapilnog alkohola (3,5-dimetoksi-4-hidrocinamil alkohol) (slika 4). Prema tome, lignini četinjača i listača razlikuju se po sadržaju metoksila, ali treba napomenuti da ove grupe nedozvoljavaju potencijalna reaktivna mjesta i smanjuju poprečno vezivanje.

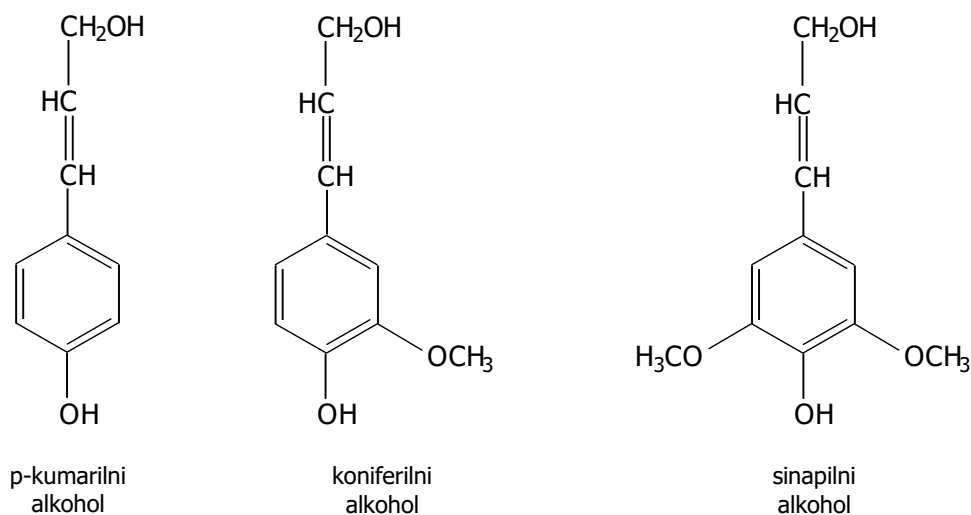
Aromatski i fenolni karakter lignina debela ovisi o svom izvoriku, kao i o metoksilnom sadržaju. Više od dvije trećine fenilpropanskih jedinica u ligninu su vezane ugljik-kisik (eterskim) vezama, dok su ostale ugljik-ugljik veze. Ovo objašnjava utvrđene uvjete potrebne za njegovu depolimerizaciju i nesposobnost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

Već je dugo poznato da se lignini četinjača, listača i ostalih lignoceluloznih biljaka razlikuju ovisno o njihovom sadržaju gvajacilnih (G), siringilnih (S) i p-hidroksifenilnih (H) jedinica. S obzirom na to da klasifikacija na lignine četinjača, listača 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.



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

Gvajacilni lignini (G lignini) dio su skoro svih četinjača, uglavnom sadrže gvajacilpropanske jedinice, a u velikom dijelu su polimerizacijski produkti koniferilnog alkohola. Gvajacil-siringilni lignini (G-S lignini) tipični su za listače, uglavnom su sastavljeni od gvajacil- i siringilpropanskih jedinica, te nastaju kao kopolimeri koniferilnog i sinapilnog alkohola uz mali udio p-hidroksifenilnih jedinica, u omjeru koji varira između 4:1 do 1:2 za dvije monomerne jedinice. p-hidroksifenil-gvajacil-siringilni lignini (H-G-S lignini) tipični su za ostale vrste lignocelulznih biljaka, a sastavljeni su od p-hidroksifenil-, gvajacil- i siringilpropanskih jedinica u molarnom omjeru koji je ovisan o prirodi biljne vrste. 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 β -O-4 veza kao najučestalija a za njom slijede β -5, 5-5, β -1 i α -O-4 veze.



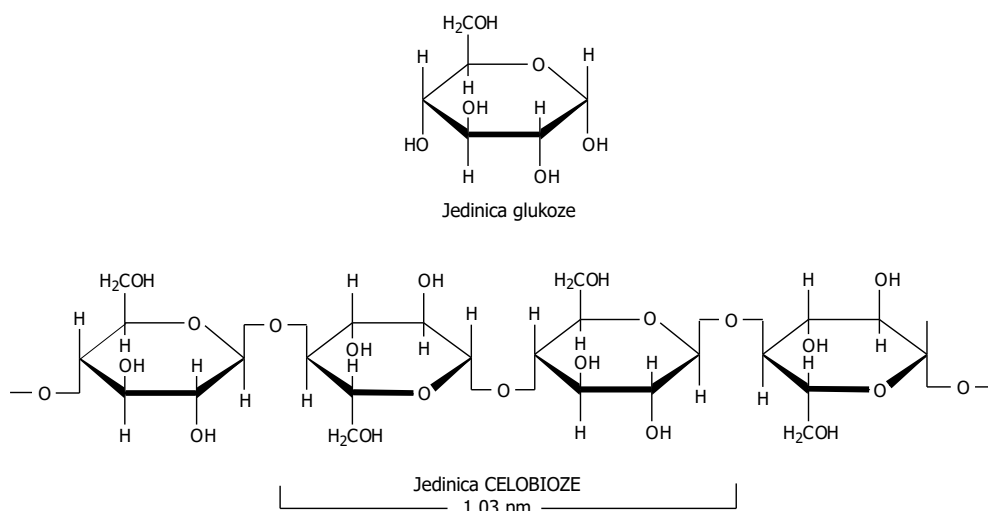
Slika 4. Osnovne građevne jedinice lignina (tzv. prethodnici lignina)

2.4. Celuloza

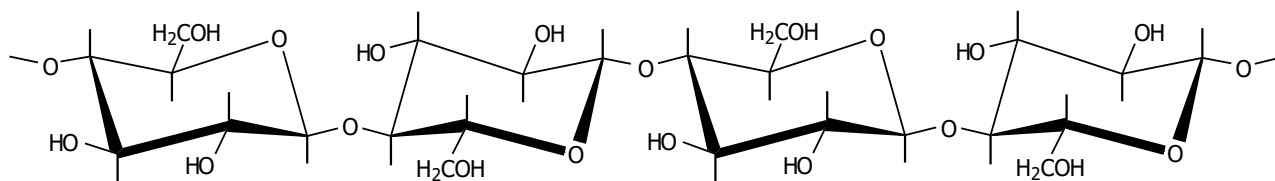
Celuloza je osnovni strukturni temelj biljnih stanica, te je kao takva najvažnija prirodna tvar koju proizvode živi organizmi. U biosferi se $27 \cdot 10^{10}$ t ugljika nalazi u živim organizmima, od toga se 99% odnosi na biljke. U celulozi se nalazi 40% ukupnog ugljika biljaka (u ligninu 30%, u ostalim 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. Najčišća celuloza u prirodi je vlakno pamuka, koje sadrže 95-99% celuloze iskazano na apsolutno suhu tvar, lan sadrži 80-90% celuloze, konoplja 65-75%, juta 60-70% i ramija oko 85% celuloze. Celuloza, kao glavni građevni element drva, tvori oko 40% suhe tvari u većini vrsta drva (i u četinjačama i u listačama), 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 čvrstoću.

Celuloza sadrži jedinice β -D-glukopiranoze koje su tako povezane da tvore molekularni lanac. Prema tome, celuloza se može opisati kao linearno polimerni glukan s jednolikom strukturom lanca. Jedinice su međusobno povezane β -1,4-glikozidnim vezama. Dvije susjedne jedinice glukoze povezane su međusobno eliminacijom jedne molekule vode između njihovih hidroksilnih grupa na ugljiku 1 i ugljiku 4. β -pozicija OH-grupe na C1 zaokrenuta je za 180° na sljedeću jedinicu glukoze oko C1-C4 osi prstena piranoze. Ponavljajuća jedinica

celuloznog lanca se naziva celobiozna jedinica (osnovna građevna jedinica je zapravo disaharid) s dužinom od 1,03 nm (slika 5). Kao rezultat, linearni celulozni lanac je žilav i ravan u usporedbi s heličnom tvorevinom frakcije α -vezane amilaze škroba. Na slici 6 prikazana je stereo-kemijska formula celuloze.



Slika 5. Kemijska formula glukoze i celuloznog lanca

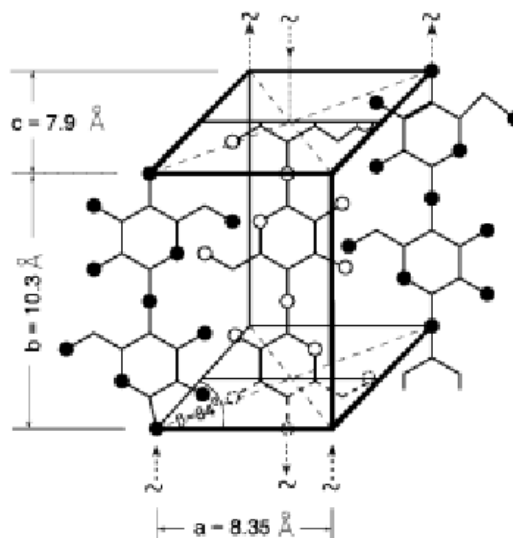


Slika 6. Stereo-kemijska formula celuloze

Molekularna težina celuloze široko varira (50 000-2,5 mil.) ovisno o izvoru uzorka. S obzirom na to 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 vlakanca, te najveći 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 čvrstom stanju vodikove veze čine uređenu, kristalnu rešetku. Opće prihvaćeni model kristalne jedinice celuloze dali su Meyer i Misch 1937. Taj model je i dan danas opće prihvaćen.



Slika 7. Meyer-Mischov model kristalne jedinice celuloze I (Meyer i Misch, 1937)

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° (slika 7). Celuloza I sadrži pet molekula celobioze, a svaki glukozni prsten u odnosu na susjedni zaokrenut je za 180° što je u skladu sa spiralnom simetrijom. Glukozni ostaci međusobno su vezani 1,4- vezama. U ovom modelu celuloze 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 postojane 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).

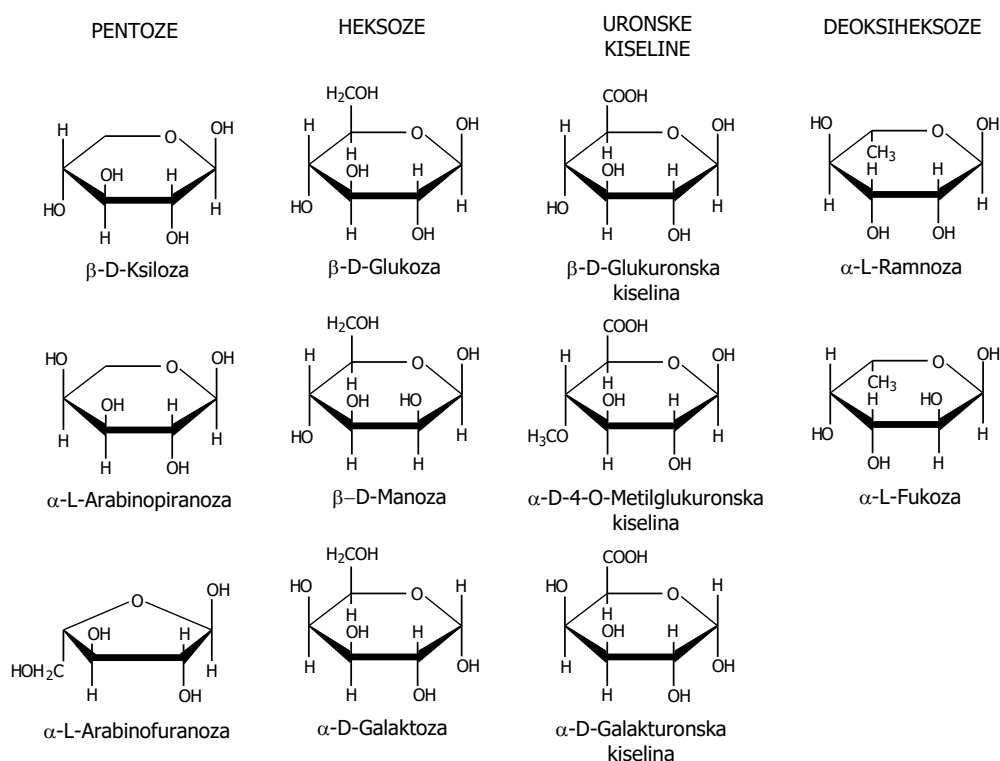
Celulozni polimorf III je produkt tretmana celuloze I s tekućim amonijakom pri temperaturi -80°C uz kasnije obvezno ispiranje alkoholom. Alkalijskim tretmanom celuloze III dobiva se celuloza II. Celulozni polimorf IV nastaje grijanjem celuloze III u glicerolu pri 260°C (Rowell i sur., 2005). Celulozni 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 stijenkama, 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 mnogo kraćem molekulskom lancu i po granjanju lanca molekula. Jedinice šećera (anhidro-šećeri) koji tvore polioze mogu se podijeliti na grupe kao što su pentoze, heksoze, heksouronske kiseline i deoksi-heksoze (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.

Klasična podjela 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 većini 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. Listače i četinjače ne samo da se razlikuju u postotku ukupnih polioza, nego isto tako i u postotku pojedinih polioza i sastavu tih polioza.

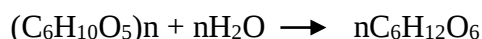


Slika 8. Formule šećernih komponenata polioza

Hemiceluloza se degradira na temperaturama od 200-260 °C, dajući više hlapljivih tvari, manje katrana i manje ugljena od celuloze. Većina hemiceluloze ne sadrži značajnu količinu levoglukozana. Većina octene kiseline koja se oslobodi iz drva tijekom pirolize pripisuje se deacetilaciji hemiceluloze. Hemiceluloza listača bogata je ksilanima i sadrži manju količinu glukomanana. Hemiceluloza četinjača pak sadrži manju količinu ksilana, ali je bogata galaktoglukomananima. Početak termičke degradacije hemiceluloze dešava se pri nižim temperaturama od kristalične celuloze. Gubitak hemiceluloze zbiva se pri sporoj pirolizi drva u temperaturnom rasponu od 130-194 °C, gdje se većina izgubi iznad 180 °C.

3. ENZIMATSKA HIDROLIZA DRVA

Proces pretvorbe lignocelulozne biomase u fermentirajuće šećere naziva se hidroliza. Kompletna hidroliza celuloze kao rezultat daje glukozu dok su proizvodi hidrolize hemiceluloze pentoze i heksoze od kojih se najviše ističu manozna i ksiloza (Taherzadeh i Karimi, 2007a) Tako se isti procesi pretvorbe, kemijska pretvorba i fermentacija sirovine koji su već na komercijalnoj razini i kojima se proizvode npr. etanol, mliječna kiselina, lizin itd. iz glukoze iz sirovine bogate škrobom, mogu se koristiti i u proizvodnji glukoze dobivene hidrolizom celuloze. Najveći izazov hidrolize celuloze je razbijanje β -veza u kristaličnoj strukturi kojima su vezani glukoza i celuloza. Općenito hidrolizu možemo podijeliti u dvije različite vrste. Prva je kisela 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 lančanim 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 često naziva i glukan i $C_6H_{12}O_6$ je monomer glukoze. 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 značajno utječu 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, 2007b).

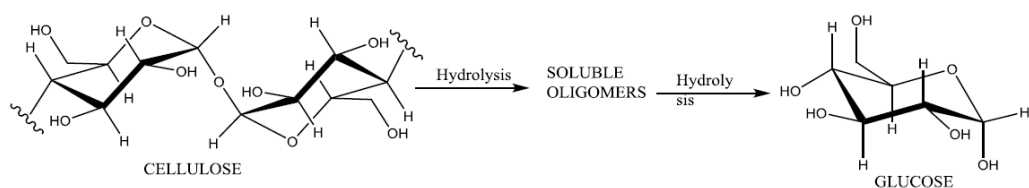
Celulaze su proteini koji razgrađuju celulozu i koji se generalno razvrstavaju u tri glavne skupine:

- 1) *endoglukanaze*- napadaju područja manje kristaličnosti celuloze te
pritom stvaraju slobodne radikale
- 2) *eksoglukonaze*- još ih se naziva i celobiohidrolaze koje hidroliziraju
1,4 – glikozidne veze u lancu celobioze
- 3) *β -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, acetilesteraze, ksilanaze, β -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 mikro fibrili. Uzimajući u obzir međumolekularne veze uklopljene u matricu polisaharida u drvu uključujući i lignin te ostale polimere, stanična stijenka je kruta i enzimatski teško razgrađiva (Wyman, 2001). Iako se mogu pojaviti određene modifikacije celuloze prilikom njene purifikacije, promjer mikrofibrila ostaje otprilike isti (3-5 nm) u staničnoj stijenci ali se dužina istih može značajno smanjiti. Mogućnost prodora celulaze u strukturu polimera celuloze podložno je dvama ograničenjima. Jedno je kristaličnost celuloze i mogućnost vezanja celuloze za ostale hidrofilne skupine putem CBH (celobiohidrolaze) I modula (Torget i dr., 1992). Drugi je anatomski struktura stanične stijenke koja također utječe na mogućnost celulaze da razgrađuje celulozu. Cilj svakog predtretmana treba biti svakako smanjiti utjecaj tih dvaju čimbenika na razvoj razgradnje celuloze. Na slici 9. je prikazan kemijski proces pretvorbe celuloze u glukozu.

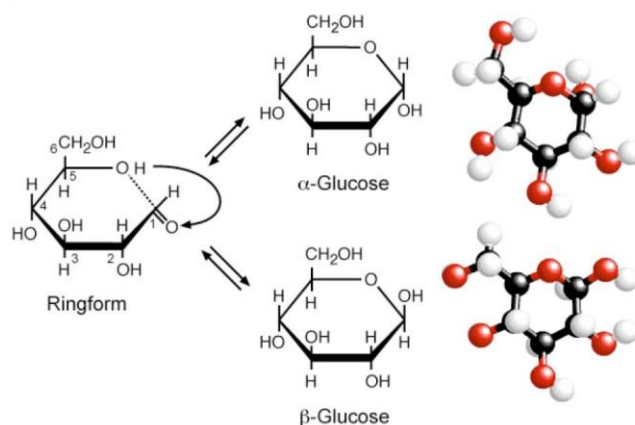
Na temelju pretpostavke da je enzimatska hidroliza celuloze površinska reakcija, jedno od najutjecajnijih obilježja biomase trebala bi biti dostupnost površine celuloze za prodor celulaza (Li i dr., 2003). Dostupnost celuloze također se može povezati s ostalim faktorima vezanim za supstrate predtretiranja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



Slika 9. Prikaz kemijskog procesa pretvorbe celuloze u glukozu
(Morales-delaRosa, S. i dr., 2014.)

3.1. Glukoza

Enzimatskom hidrolizom drvene biomase izolira se glukoza. Glukoza je monosaharid molekulske formule $C_6H_{12}O_6$. Zbog toga se još naziva i aldoheksozo. Molekula glukoze može biti u obliku otvorenog lanca ili u cikličnom obliku koji je rezultat intramolekularne reakcije između atoma ugljika u aldehidnoj skupini i hidroksilne skupine na atomu C-5 kako bi se tvorio intramolekularni poluacetat. Postoje dva izomera, α i β glukoza što ovisi o tome nalazi li se hidroksilna skupina iznad ili ispod prstena molekule (slika 10). U vodenim otopinama oba oblika su u ravnoteži i kod vrijednosti pH 7, ciklični oblik je predominantan. Postoje dva oblika molekule glukoze, L- i D- oblik, no samo se D-glukoza može naći u prirodi. Razlika je u položaju hidroksilne skupine s lijeve odnosno desne strane ugljikova lanca, odnosno na zadnjem asimetričnom atomu ugljika (Rosanoffovo pravilo). Glukoza je primarni izvor energije živim organizmima. U prirodi se nalazi u biljkama u slobodnom obliku.



Slika 10. Prikaz α i β izomera glukoze

(izvor: <https://www3.hhu.de/biodidaktik/zucker/sugar/glukose.html>)

4. CILJEVI RADA

U ovom radu istraživani je utjecaj različitih kemijskih metoda predobrade drva crne topolovine (*Populus nigra* L.) na proces i krajnje proizvode enzimatske hidrolize. Osnovni ciljevi rada koji su bili predmetom istraživanja, a vezani su za istraživanje procesa i proizvoda enzimatske hidrolize su određivanje:

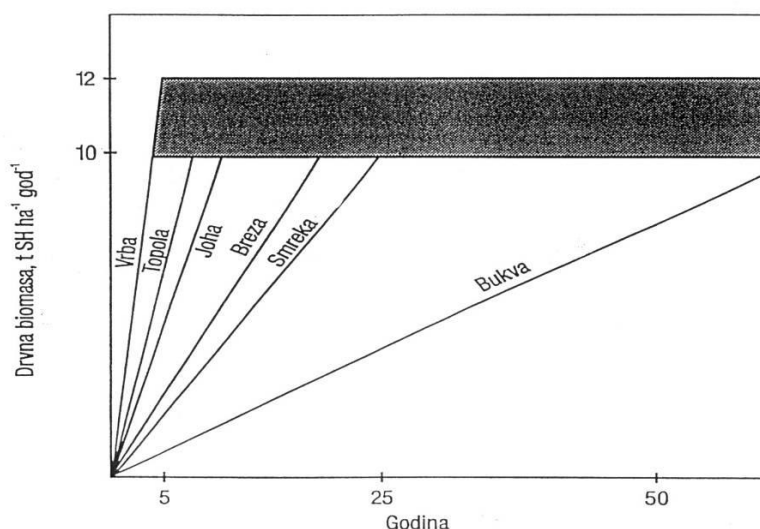
- grupnog kemijskog sastava drva crne topolovine,
- sadržaja lignina acetil-bromidnom metodom,
- utjecaj zaostalog lignina u uzorku na proizvode enzimatske hidrolize,
- količine razgrađenog uzorka u ovisnosti o metodi predobrade drva,
- koncentracije otopljene D-glukoze u ovisnosti o metodi predobrade drva,
- mase otopljene D-glukoze i kvantitativnog iskorištenja početnog uzorka drva,
- utjecaja pH vrijednosti na proces enzimatske hidrolize,
- sadržaja suhe tvari supernatanta.

Nadalje, kao jedan od osnovnih ciljeva, je da rezultati ovog istraživanja pridonese boljem razumijevanju problematike pretvorbe celuloze u D-glukozu, te će kao takvi poslužiti 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 dugačkim 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, sađi 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, ploča iverica i sl. (Izvor: <http://www.plantea.com.hr/crna-topola>). Crna topola je svakako jedna od glavnih predstavnica brzorastućih vrsta šumskog drveća 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, sječku ili drvenu 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. Prosječan 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 sita Cisa RP.08 (frekvencija trešnje 6 kHz – srednje snage, vibracijska amplituda 1.5mm, vrijeme trešnje $\tau = 30$ min). Uzorci su prosijani kroz standardizirano sito (ISO – 3310.1) dimenzije oka 0,25 mm (100–150 oka/cm²). U tablici 2. su navedene karakteristike kolutova uzoraka crne topolovine.

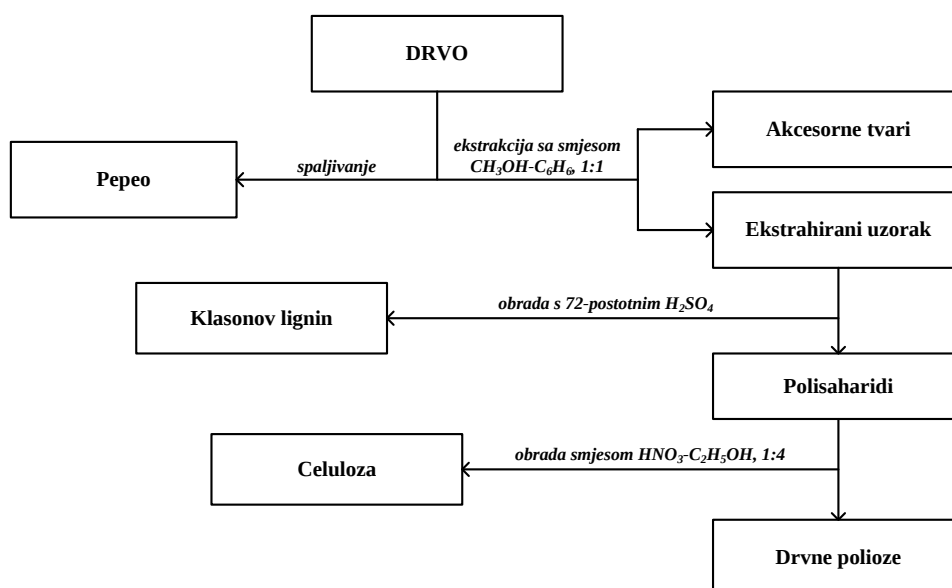
Tablica 2. Uzorci drva crne topolovine

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 (Antonović 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 tablicama 3 i 4 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, CH_3OH i benzena, C_6H_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 (sa 72-postotnom sumpornom kiselinom, H_2SO_4) i polisaharidi celuloza (sa smjesom otapala dušične kiseline, 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):

5.3.1. Određivanje sadržaja pepela (P)

Spaljivanjem 2-3 g uzorka u porculanskom lončiću u električnoj peći, na temperaturi od 525 °C tijekom 30 min (TAPPI T211 om-02). Postotak pepela izračunava se prema izrazu:

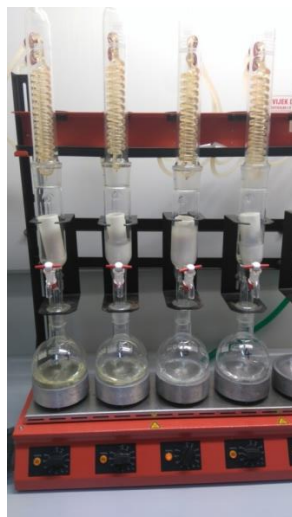
$$P = \frac{a}{b} \times 100 [\%]$$

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

5.3.2. Određivanje sadržaja akcesornih tvari (AT)

Prema normi TAPPI T204 cm-97 provodili su se procesi određivanja sadržaja akcesornih tvari u uzorku drva. Za određivanje sadržaja akcesornih tvari koristila su se sljedeća otapala:

- a) destilirana voda – preko uzorka mase 10 g prelijeva se 200 mL destilirane vode. Ekstrakcija traje 8 sati i odvija se pri temperaturi od 90°C. Po isteku zadanog vremena ekstrakcije tikvica s ekstraktivnim tvarima topivim u vodi se stavlja u sušionik te se suši na temperaturi od 103±2°C do trenutka postizanja konstantne mase.
- b) smjesa otapala benzen-etanol - ekstrakcija 10 g usitnjenog uzorka u Soxhletovoj aparaturi s 200 mL smjese otapala benzen-etanol u omjeru 1:1 traje 8-10 sati tj. do potpune bezbojnosti otapala u kojem se nalazi tuljac s uzorkom. Po završetku ekstrakcije tikvica se suši u sušioniku na temperaturi od 103±2°C do konstantne mase. Smjesa otapala benzen-etanol iz drva ekstrahira ugljikohidrate niske molekularne mase, soli i ostale spojeve koji nisu topivi u vodi. Revizijom norme iz 2007. preporučeno je zamijeniti benzen s toluenom zbog toksičnosti benzena. Izloženost parama benzen može dovesti do stvaranja malignih tvorbi u organizmu.
- c) smjesom otapala toluen-etanol – provodi se isti postupak kao i kod ekstrakcije smjesom otapala benzen-etanol. Omjer toluena i etanola je drugačiji nego kod benzena i etanola. Ovdje se radi o omjeru 2:1 u korist toluena. Mogu se očekivati niže dobivene vrijednosti zbog manje agresivnosti toluena kao kemikalije.
- d) diklorometanom – ekstrakcija se također provodi Soxhletovoj aparaturi uz 200 mL diklorometana. Diklorometan iz drva ekstrahira masti, ulja, smole, voskove i ostale ne hlapljive komponente.



Slika 13. Prikaz Soxhletove aparature za izolaciju ekstraktivnih tvari

Po završetku svake ekstrakcije se iz dobivenih podataka izračuna 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);

5.3.3. Određivanje sadržaja lignina (L)

Određivanje sadržaja lignina odvija se kuhanjem prethodno ekstrahiranog uzorka obrađenog 72-postotnom H_2SO_4 u trajanju 2,5 sata, uz dodatak vode, tijekom 4 sata. Zatim se filtrira i suši u sušioniku, na temperaturi 103 ± 2 °C do konstantne mase. Po završetku procesa dobije se lignin kao kruti ostatak (TAPPI T222 om-06). Sadržaj lignina računa se na osnovi izraza:

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

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

5.3.4. 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 natrijeva klorita ($NaClO_2$), 60 mL octene kiseline (CH_3COOH) 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 pojedinačnog 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 ohlađena te filtrirana. Tako isfiltriran uzorak se sušio pri sobnim uvjetima 24 sata te je potom i tehnički sušen u sušioniku na temperaturi od 30°C tijekom 24 sata. Ovako pripremljena holoceluloza sušena je pri blagim uvjetima jer se pri visokoj temperaturi holoceluloza degradira. Sadržaj holoceluloze računa 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);

5.3.5. Određivanje sadržaja celuloze (C)

Određivanje sadržaja celuloze odvija se kuhanjem 1 g ekstrahiranog uzorka sa smjesom HNO₃ i C₂H₅OH u omjeru 1:4 do izbijeljenog taloga. Po završetku kuhanja talog se filtrira i suši u sušioniku na temperaturi 103±2°C, do konstantne mase. Sadržaj celuloze računa se prema izrazu:

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

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

5.3.6. Određivanje sadržaja drvnih polioza (DP) – hemiceluloze

Udio ukupnih drvnih polioza nije posebno određivan ni analiziran, već je određen računski, na osnovi udjela ostalih komponenata u uzorku. Sadržaj drvnih polioza računa se prema izrazu:

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

5.4. Određivanje sadržaja lignina acetil-bromidnom metodom

Postupku određivanja lignina acetil-bromidnom metodom bili su podvrgnuti uzorci iz kojih su prethodno bile izolirane akcesorne tvari različitim otapalima a sve u svrhu

razjašnjavanja veze između količine zaostalog lignina i oslobođene glukoze iz celuloznog polisaharida.

Za acetil-bromidnu metodu prema Johnson, Moore i Zank (1961) potrebni su nam: 5-100 mg ekstrahiranog uzorka koji u potpunosti mora biti suho. U 15 mL vialu dodaje se apsolutno suhi uzorak i 5 mL 25%-ne otopine acetil bromida u octenoj kiselini. Nakon što su svi sastojci pomiješani, viala se zatvori teflonskim čepom i zagrijava se na 70°C kroz 30 min. Po završetku digestije, sadržaj viala kvantitativno se prenese u volumetrijsku tikvicu od 100 mL u kojoj se nalazi 10 mL NaOH, 25 mL octene kiseline, 1 mL 7,5 M hidroksilamina, te se do oznake napuni octenom kiselinom. Uz sam uzorak, paralelno se priprema slijepa proba koja prati korake postupka, ali bez dodatka uzorka, a služi kako bi se mogle na vrijeme otkriti i spriječiti sustavne pogreške mjernog uređaja. Na kraju samog procesa spektrofotometrijski se odredi apsorpcija pri valnoj duljini od 280 nm, no bolje je snimiti cijeli spektar od 250-400 nm. Pomoću izmjerenih apsorpcija izračunaju se koncentracije uzorka u smjesi.

Kvantitativni sadržaj lignina računa se sljedećim izrazom:

$$L_{a-b} = \frac{100 \times \text{ABS} \times V}{b \times a \times w \times 1000} [\%]$$

gdje je: ABS- absorbanca UV-spektrofotometra, V- volumen uzorka (mL), b-duljina prolaza svjetlosti (cm), a- koeficijent ekstinkcije, w- masa uzorka (g)

5.5. Izbijeljivanje drvnih vlakana

Za prinos izbijeljenih drvnih vlakana koristila se modificirana Franklinova metoda (Chaffey, 2002). Iz uzorka drva mehaničkim se putem usitni ispitivani uzorak te se prosijava kroz sito otvora oka 1 mm. Po 10 g izvaže se s točnošću od 0,1 mg i stavljaju u staklene bočice zapremnine 500 mL s navojem i PE čepom. Dva uzorka se izdvajaju kako bi se koristili za gravimetrijsko određivanje sadržaja suhe tvari drva. U staklene bočice s uzorkom pipetom se dodaje po 300 mL reakcijske smjese kemikalija. Reakcijska smjesa sastoji se iz jednakih volumena omjer 1:1 vodikova peroksida i ledene octene kiseline. Nakon dodavanja smjese, bočice s reakcijskom smjesom stajale su 48 sati na mjestu koje nije izloženo sunčevom svjetlu. Nakon 48 sati zatvorene staklene bočice stavljaju se u sušionik na temperaturu od 60°C kroz 1-2 dana, osim korištenja sušionika uzorci se mogu grijati u vodenoj kupelji pri 100°C kroz 8 sati (slika 14). Unutar navedenog vremena drvo bi trebalo u potpunosti izbijeliti. Izbijeljena reakcijska smjesa iz bočice se vrlo pažljivo dekantira, a

uzorak u bočici se vrlo nježno 3-4 puta ispire s po 300 mL destilirane vode. U bočice se dodaje natrijev karbonat kako bi se neutralizirala preostala octena kiselina. Potrebno je pažljivo dodavati natrijev karbonat jer u dodiru s octenom kiselinom stvara pjenu koja može prerano iskidati uzorak. Nakon što se smanji pjena, uzorak se ispire 3-4 puta s po 300 mL destilirane vode. Sadržaj iz bočica se filtrira preko plastičnog sita. Potrebno je koristiti plastično sito kako prilikom sušenja vlakana ne bi došlo do pregrijavanja i toplinskog degradiranja istih. Filtrirana drvena vlakna suše se u sušioniku pri temperaturi od $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ kroz 24 sata. Drvena vlakna se prebacuju u prethodno izvagane plastične bočice te se kvantitativno računa prinos vlakana.

Prinos vlakana izražava se postotno, prema slijedećem izrazu:

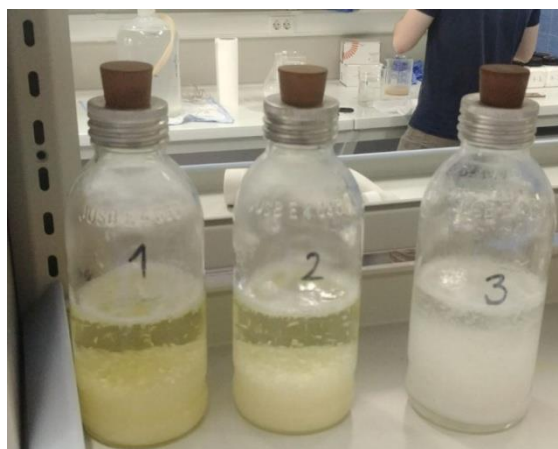
$$V = \frac{b - a}{c} \times 100 \quad [\%]$$

V – prinos vlakana, %

b – masa osušenog filter papira i uzorka, g

a – masa osušenog filter papira, g

c – masa apsolutno suhog uzorka, g



Slika 14. Reakcijske smjese drvnih vlakana i otapala

5.6. Enzimatska hidroliza

Za enzimatsku hidrolizu koristili su se uzorci prethodno tretirani kemijskim tretmanima kako slijede: 1) ekstrahirano drvo smjesom otapala benzen-etanol (BE), 2) ekstrahirano drvo smjesom otapala toluen-etanol (TE), 3) ekstrahirano drvo diklorometanom (DKM), 4) ekstrahirano drvo destiliranom vodom (DV), 5) uzorci holoceluloze (HC), 6) uzorci drvnih vlakana (PO) te 7) netretirano drvo (NT) uzeto kao nulta proba. Enzimatskoj hidrolizi bilo je podvrgnuto drvo 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.

Enzimatska hidroliza se odvijala prema prethodno definiranim uvjetima koje su razvili Stanešić i Podvorec (2018). Hidroliza se odvijala u Erlenmayer-ovoj tikvici volumena 300 mL u otopini pufera natrijeva citrata ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) s pH 5,8 u jednom setu uzoraka te pH 6,3 u drugom setu uzoraka i natrijeva azida (NaN_3). Ulazna masa apsolutno suhog uzorka 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 dodano je 0,150 mL kompleksa enzima. Promatran je utjecaj različitih tipova kemijskih predretmana i kemikalija kojima se drvo tretiralo na proces i proizvode enzimatske hidrolize. Točnije, na sadržaj suhe tvari (%), koncentraciju glukoze (g/L), krutog ostatka u procesu (%), masu dobivene glukoze (g;%). Natrijev azid dodavan je smjesi u postotnom odnosu mase apsolutno suhog uzorka celuloze i volumena natrijeva citrata te je iznosio 0,03%. Trajanje hidrolize iznosilo je 72 h. Enzimatska hidroliza se odvijala u termostatiranoj kupelji s mogućnošću trešnje. Temperatura procesa iznosila je 50°C pri brzini trešnje od 200 pomaka/min (Slika 15).



Slika 15. Uzorci spremni za početak enzimatske hidrolize u termostatiranoj kupelji s miješalicom

5.7. Određivanje sadržaja suhe tvari supernatanta

Sadržaj suhe tvari određen je uz pomoć ručnog refraktometra *Atago Pocket PAL- α* (slika 16). 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. Prethodno mjerenju sadržaja suhe tvari refraktometrom

vagana je vijala sa supernatantom filtriranim neposredno po završetku hidrolize. Nakon vaganja sadržaj vijale je prenesen u drugu posudu te je viala isprana destiliranom vodom i osušena u sušioniku pri $103 \pm 2^\circ\text{C}$ u trajanju od 24 sata. Prazna viala također je izvagana nakon što se ohladila. Razlikom u masama određena je masa dobivene glukoze u procesu hidrolize izražena u gramima. Isto tako, određen je i kvantitativni udio glukoze u apsolutno suhom ulaznom uzorku.



Slika 16. Ručni refraktometar *Pocket PAL-α*

5.8. Određivanje koncentracije D-glukoze

Koncentracija D-glukoze u supernatantu mjerila se pomoću UV spektrofotometra *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 kako slijedi:

1. *glukoza oksidaza / peroksidaza reagens*

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

2. *o-dianizidin reagens*

Neotvoreni reagens se pohranjuje na $2-8^\circ\text{C}$. Valja smanjiti izlaganje svjetlu na minimum. Prethodno vagana bočica 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-dianisidinskog 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 sljedećim redoslijedom:

1. Određivanje kalibracijske krivulje 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 točno 30 minuta na 37°C (slika 18). Zaustaviti reakciju u intervalima od 30 do 60 sekundi dodavanjem 2 mL 12N H₂SO₄ 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 određen kalibracijski pravac, može se izraziti i njegova jednadžba pravca. Kasnije se pregledom rezultata može putem te jednadžbe utvrditi točna koncentracija D-glukoze u svakom izmjerenom uzorku. Vrijednost R² kalibracijskog modela ne smije biti manja od 0,99 tj. cilj izrade kalibracijske krivulje je da se može garantirati za sve dobivene vrijednosti sa sigurnošću od 99%.

6. REZULTATI S RASPRAVOM

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

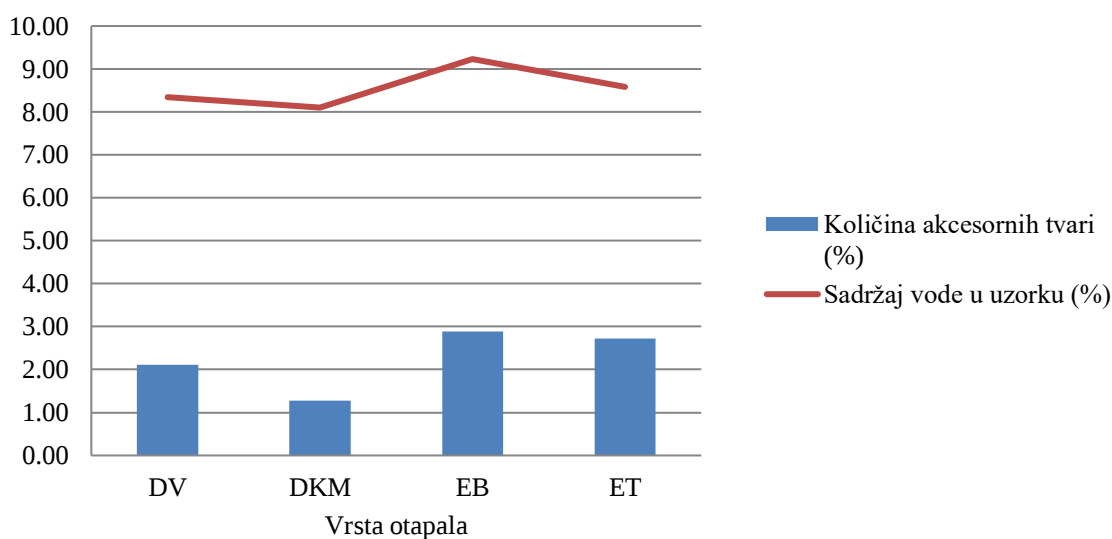
Na temelju provedenih istraživanja vezanih za analizu grupnoga kemijskog sastava drva crne topolovine, dobiveni su rezultati mogu prikazati u tablici 3.

Tablica 3. Rezultati analize sadržaja ekstraktivnih tvari različitim metodama izolacije

Broj uzorka	DV ekstrakt (%)	DKM ekstrakt (%)	BE ekstrakt (%)	TE ekstrakt (%)
1	2,18	1,31	2,94	2,77
2	2,05	1,19	2,84	2,68
3	2,10	1,33	2,90	2,74

U tablici 3. DV označava ekstrakciju destiliranom vodom, DKM ekstrakciju diklorometanom, BE ekstrakciju smjesom otapala benzen-etanol i TE ekstrakciju smjesom otapala toluen-etanol.

Iz rezultata vidljivih u tablici možemo zaključiti kako je najviše ekstraktivnih tvari izolirano u smjesi otapala etanol-benzen što objašnjava upravo prethodno navedena agresivnost benzena dok je najmanje izolirano diklorometanom. Drvo crne topole nije bogato uljima, mastima i smolama stoga je upravo ovaj omjer podataka očekivan.



Slika 17. Prikaz odnosa sadržaja vode i sadržaja akcesornih tvari u uzorku

Na slici 17. Prikazana su kretanja sadržaja akcesornih tvari i sadržaja vode u uzorku. Iako se vrijednosti akcesornih tvari kreću u skladu s predviđenim kretanjima, valja primijetiti kako se krivulja sadržaja vode kreće paralelno s vrijednostima količine akcesornih tvari u uzorku.

Tablica 4. Rezultati određivanja sadržaja celuloze, holoceluloze i Klasonova lignina

Broj uzorka	Celuloza (%)	Holoceluloza (%)	Lignin (%)
1	47,82	75,24	21,49
2	50,16	76,32	20,49
3	49,15	77,41	19,35

Tablica 5. Rezultati prinosa izbijejenih drvnih vlakana modificiranom Franklinovom metodom

Broj uzorka	Prinos vlakana (%)
1	74,82
2	76,41
3	77,23

Općenito, dobiveni rezultati 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.

6.2. Sadržaj lignina određen acetil-bromidnom metodom

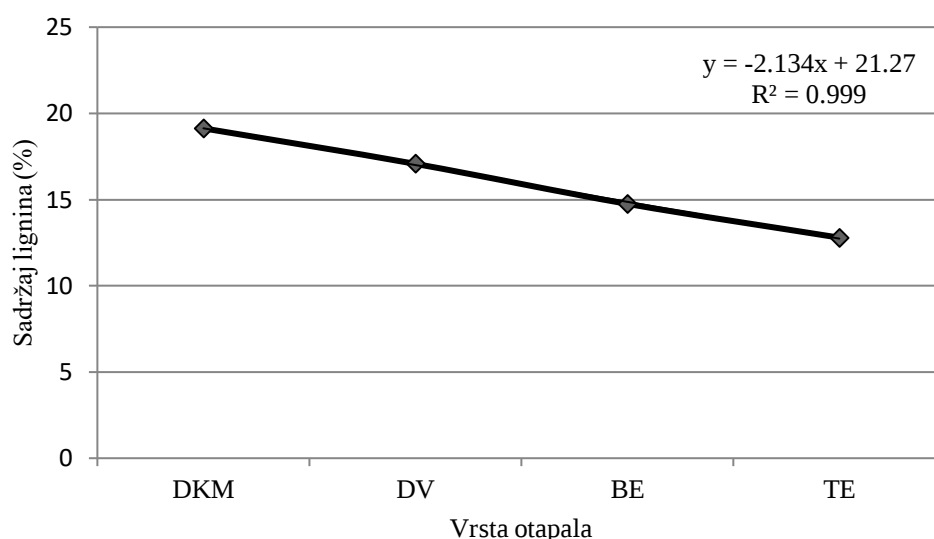
Tablica 6. Rezultati količine lignina dobiveni acetil-bromidnom metodom

	Sadržaj lignina L _{a-b} (%)						
Uzorak	BE	TE	DKM	DV	HC	PO	C
L(%)	14,75	12,79	19,13	17,07	~0	~0	~0

U tablici 6. BE označava uzorke ekstrahirane smjesom otapala benzen-etanol, TE uzorke ekstrahirane smjesom otapala toluen-etanol, DKM uzorke ekstrahirane diklorometanom, DV uzorke ekstrahirane destiliranom vodom, HC uzorke holoceluloze, PO uzorke izbijejenih drvnih vlakana i C uzorke celuloze.

Prikazana tablica 6. ukazuje na količinu zaostalog lignina u uzorcima prethodno tretiranim različitim metodama predobrade. Uzorci holoceluloze, drvnih vlakana i celuloze nisu bili ispitivani acetil-bromidnom metodom već se postavila pretpostavka kako je količina lignina u tim uzorcima približno jednaka nuli. Postupci za dobivanje holoceluloze, celuloze i izbijeljenih drvnih vlakana vrlo su agresivni. Stoga smijemo pretpostaviti da lignina u tim uzorcima zapravo i nema.

Slika 18. prikazuje rezultate ispitivanja sadržaja lignina acetil-bromidnom metodom i njihovo kretanje u ovisnosti o metodi predobrade sirovine. Kako je kod opisa metoda objašnjeno, logično je bilo za očekivati kako će ekstrakcija diklorometanom rezultirati najvišim sadržajem zaostalog lignina.



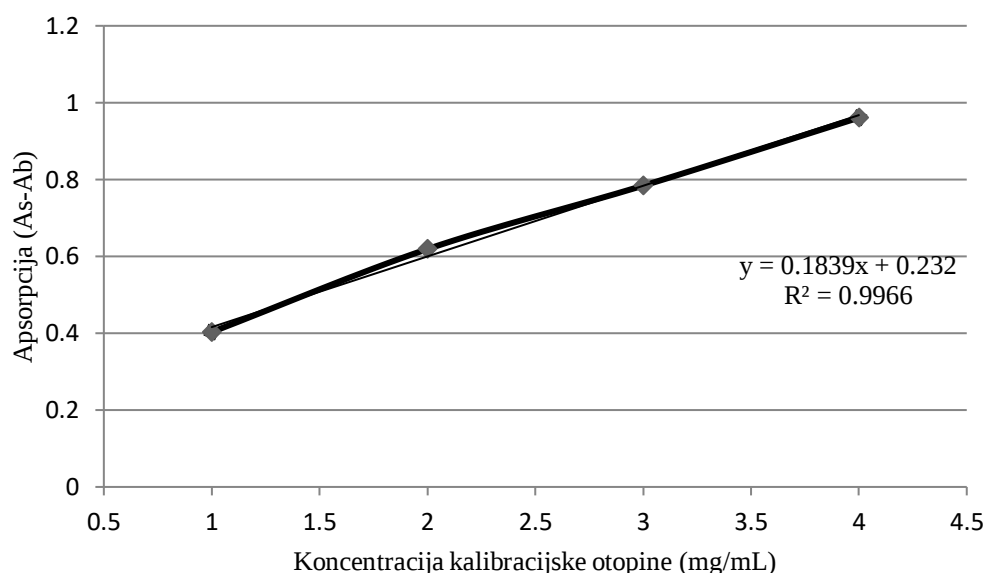
Slika 18. Sadržaj lignina u ovisnosti o vrsti otapala

6.3. Proces i proizvodi enzimatske hidrolize

6.3.1. Određivanje koncentracije D-glukoze

Uzorci supernatanta podvrgnuti su preciznoj, analitičkoj, metodi određivanja koncentracije D-glukoze, UV-spektrofotometriji. Prije samog određivanja 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 točnu koncentraciju D-glukoze u svakom uzorku, vrijednost pravca trenda R^2 nam govori kako svaki dobiveni rezultat možemo tvrditi s 99,6% sigurnošću. Na znanstvenoj razini, ta vrijednost govori o ozbiljnosti i točnosti ispitivanih uzoraka. Kalibracijski pravac

prikazan je na slici 19. Nakon određivanja kalibracijske krivulje, svi uzorci podvrgnuti su po tri puta analizi UV-spektrofotometrom. Rezultati koncentracija D-glukoze prikazani su u tablici 7.



Slika 19. Kalibracijski pravac za UV-spektrofotometrijsku analizu uzoraka hidrolize ovisnim o vrsti otapala za predobradu ulazne sirovine

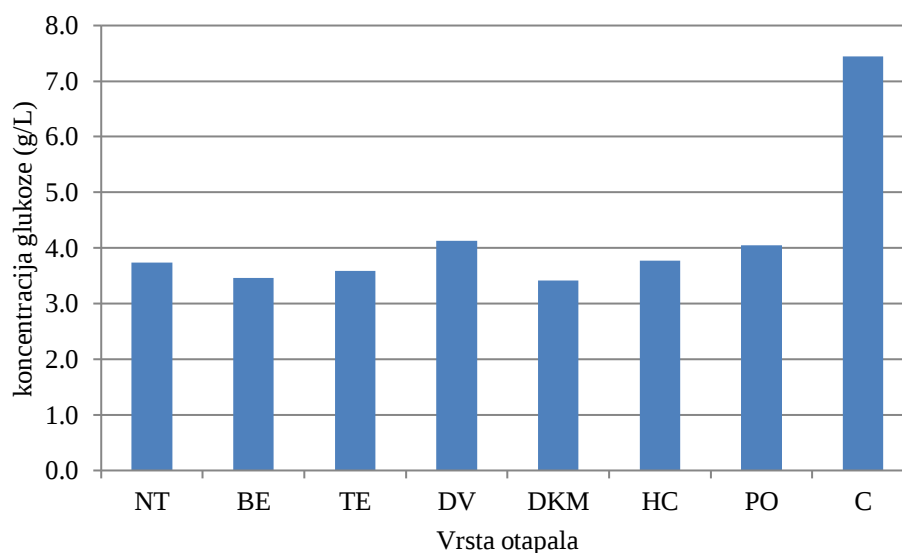
Tablica 7. Prikazuje kretanje koncentracije D-glukoze u supernatantu ovisno o prethodnoj metodi predobrade ulazne sirovine. Na tablici se vidi kako od svih koncentracija najviše iskače koncentracija D-glukoze izolirana iz čiste celuloze. Budući da je celuloza polimer sačinjen od glukoze taj rezultat nas ne treba čuditi. Budući da je standardna devijacija uzoraka koji su prethodno prošli različite metode ekstrakcije akcesornih tvari manja nego kod uzoraka holoceluloze, celuloze i izbijeljenih drvnih vlakana, možemo zaključiti kako za postizanje visoke koncentracije D-glukoze zapravo nije niti bitna metoda ekstrakcije. Prilikom odabira metode ekstrakcije uvijek treba paziti na to da jedan od glavnih bude što manja toksičnost otapala. Budući ipak postoje varijacije u koncentracijama D-glukoze možemo pretpostaviti kako se različitim metodama ekstrakcije masti, ulja, voskova uklanjaju određeni spojevi koji također u nekom biokemijskom procesu mogu tvoriti glukozu.

Tablica 7. Prikaz rezultata koncentracije D-glukoze dobivenih UV-spektrofotometrijom

Broj uzorka	Koncentracija glukoze u supernatantu (g/L)							
	NT	BE	TE	DV	DKM	HC	PO	C
1	3,563	3,410	3,836	4,213	3,377	3,563	4,262	5,938
2	3,530	3,667	3,459	3,978	3,224	3,956	3,852	8,081
3	4,131	3,301	3,486	4,208	3,661	3,787	4,033	8,304
Sr.vr.	3,741	3,459	3,594	4,133	3,421	3,769	4,049	7,441
Stand. dev.	0,288					2,044		

U tablici 7. NT označava ne tretirane uzorke, BE uzorke ekstrahirane smjesom otapala benzen-etanol, TE uzorke ekstrahirane smjesom otapala toluen-etanol, DV uzorke ekstrahirane destiliranom vodom, DKM uzorke ekstrahirane diklorometanom, HC uzorke holoceluloze, PO uzorke izbijeljenih drvnih vlakana i C uzorke celuloze.

Na slici 20. prikazani su rezultati iz tablice 7. Na slici se može vidjeti kako su sve vrijednosti približno slične te kako smo naveli prije, ne može se definirati kako metoda predobrade ulazne sirovine utječe na koncentraciju D-glukoze ali možemo definirati i tvrditi kako je za postizanje što veće koncentracije D-glukoze u supernatantu potrebno najprije izolirati čistu celulozu. Čista celuloza, bez ostalih primjesa u otopini daje uvjerljivo najvišu vrijednost koncentracije D-glukoze.



Slika 20. Kretanje koncentracije glukoze u supernatantu u ovisnosti o vrsti otapala

6.3.2. Određivanje mase izolirane D-glukoze

Paralelno uz određivanje koncentracije D-glukoze određivala se i masa izolirane glukoze. Podatak o masi izolirane glukoze zapravo bi trebao biti realni pokazatelj ukupnog djelovanja procesa enzimatske hidrolize na uzorak. Mase izolirane glukoze prikazane su u tablici 8. Oznaka m_1 označava masu viala s uzorkom, m_2 masu osušene viala bez uzorka dok m_g označava masu izolirane glukoze. Također, u tablicama 8. i 9. NT označava ne tretirane uzorke, BE uzorke ekstrahirane smjesom otapala benzen-etanol, TE uzorke ekstrahirane smjesom otapala toluen-etanol, DV uzorke ekstrahirane destiliranom vodom, DKM uzorke ekstrahirane diklorometanom, HC uzorke holoceluloze i PO uzorke izbijeljenih drvnih vlakana.

Tablica 8. Vrijednosti masa D-glukoze dobivene enzimatskom hidrolizom u gramima (g)

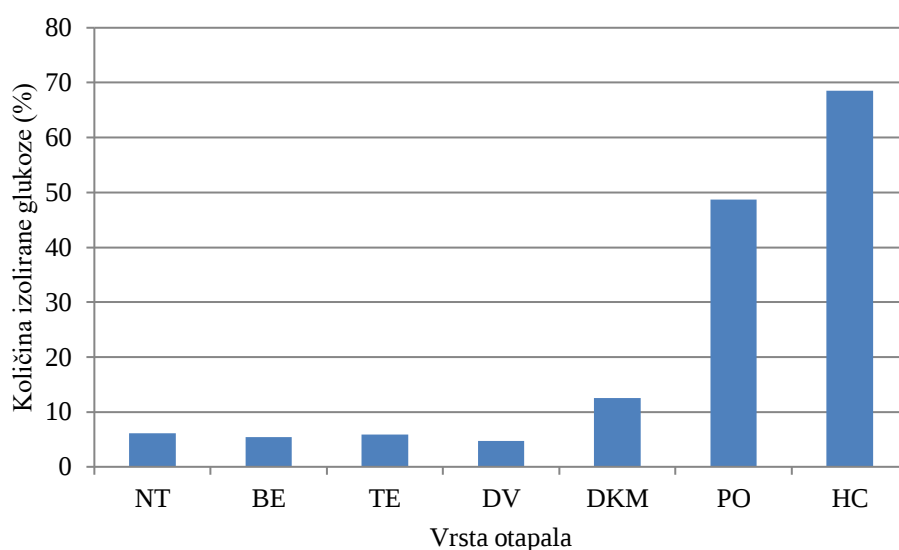
	Masa izolirane glukoze (g)						
	NT	BE	TE	DV	DKM	HC	PO
m_1	13,3566	19,7386	20,6845	14,1914	29,173	19,9975	16,5447
m_2	10,4538	16,0472	16,1404	10,1601	16,3002	10,1681	10,3037
$m_1 - m_2$	2,9028	3,6914	4,5441	4,0313	12,8728	9,8294	6,2410
m_g (g)	0,0561	0,0529	0,0530	0,0443	0,1159	0,6946	0,4306

Tablica 9. Vrijednosti masa D-glukoze dobivene enzimatskom hidrolizom izražene u postotcima (%)

	Masa izolirane glukoze u odnosu na ulaznu masu (%)						
	NT	BE	TE	DV	DKM	HC	PO
m_{asu}	0,9164	0,9678	0,9027	0,9499	0,9250	1,0128	0,8841
m_g (g)	0,0561	0,0529	0,0530	0,0443	0,1159	0,6946	0,4306
m_g (%)	6,1241	5,4671	5,8729	4,6684	12,5252	68,5839	48,7058

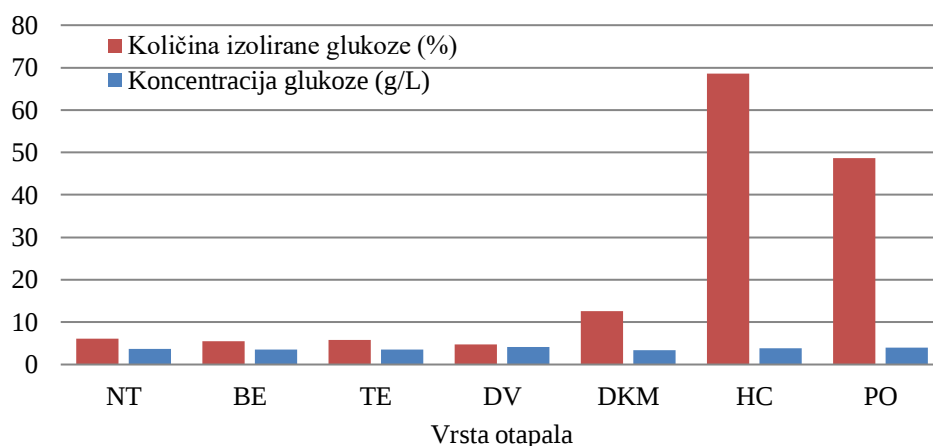
U tablici 9. prikazani su kvantificirani rezultati masa glukoze dobiveni iz uzoraka koji su predobrađeni različitim metodama. Oznaka m_{asu} označava masu apsolutno suhog uzorka, m_g (g) dobivenu masu glukoze izraženu u gramima dok m_g (%) označava postotni udio izolirane glukoze u početnoj masi uzorka. Kvantificirani rezultati prikazani su grafički na slici 21. Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako je najveći postotak D-glukoze izoliran upravo iz uzoraka holoceluloze. Kada bi se ovi podaci primjenjivali na višoj razini tj. na industrijskoj razini mogli bi reći kako bi jedna tona ulazne sirovine rezultirala s 685,58 kg D-glukoze. To je izuzetno visok postotak prerade. Ostalih 31,44% ulazne mase čine ostali složeni polisaharidi koji su spominjani u poglavlju o drvnim poliozama tj. hemicelulozi. Kada bi se

ovaj podatak preračunao u kvantitativno iskorištenje drva kojeg čini prosječno 76,32% holoceluloze, došlo bi se do podatka da se enzimatskom hidrolizom sirovine iz koje je izolirana holoceluloza dobije 52,34% glukoze tj. iz jedne tone čistog drva crne topolovine (*Populus nigra* L.) možemo dobiti 523,43 kg čiste D-glukoze. To je iznimno visok postotak kemijske prerade drva. Pogotovo kada znamo širinu primijene D-glukoze u svim industrijama. Valjalo bi napraviti i ekonomsku studiju iskoristivosti i profitabilnosti ovakve proizvodnje kako bi se postigla potpuna slika profitabilnosti ovakve industrije koja bi potencijalno privukla investitore.



Slika 21. Ovisnost postotno izolirane glukoze o vrsti otapala

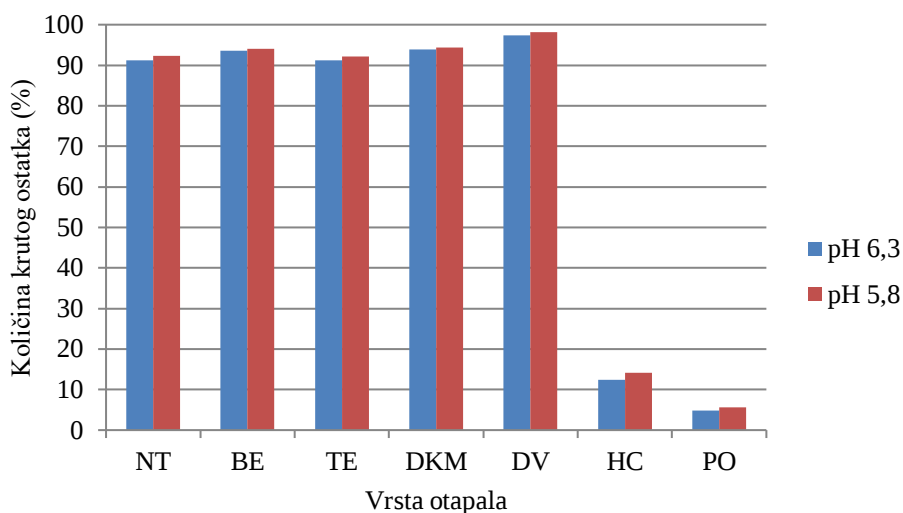
Slika 22. prikazuje ovisnost količine izolirane glukoze i koncentracije glukoze. Pregledom slike može se zaključiti kako ne postoji direktna korelacija između ta dva skupa podataka.



Slika 22. Ovisnost količine izolirane D-glukoze (%) i koncentracije D-glukoze u otopini (g/L)

6.3.3. Utjecaj pH otopine na proizvode enzimatske hidrolize

Proučavan je utjecaj dviju pH vrijednosti početne otopine za enzimatsku hidrolizu. Vrijednosti pH iznosile su 6,3 za jedan set uzoraka i 5,8 za drugi set uzoraka. Ovaj parametar proučavan je jer je u uputama za upotrebu enzima proizvođač ispisao podatke koji su najpovoljniji za maksimalnu pretvorbu uzorka u D-glukozu. Na slici 23. prikazani su rezultati ovisnosti krutog ostatka i pH vrijednosti otopine. Kruti ostatak može se zapravo protumačiti kao mjera za količinu degradiranog uzorka.

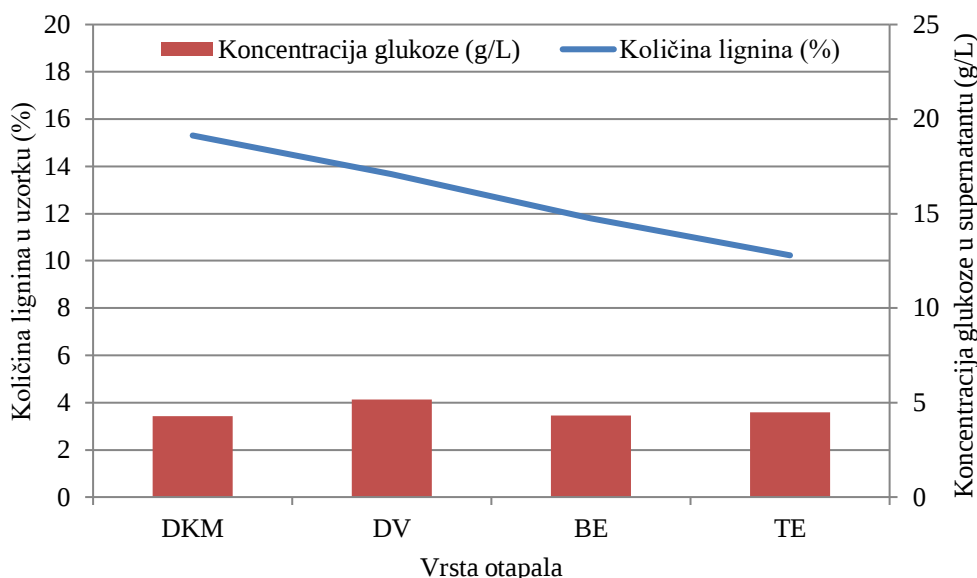


Slika 23. Ovisnost krutog ostatka o pH vrijednosti otopine

Iz grafičkog prikaza rezultata ovisnosti krutog ostatka o pH vrijednosti otopine možemo vidjeti kako je najviši stupanj degradacije postignut na uzorku izbijeljenih drvnih vlakana dok je na uzorku holoceluloze taj stupanj nešto niži no i dalje je značajno viši od uzoraka koji su prošli samo predobradu ekstrakcije akcesornih tvari. To možemo povezati s veličinom čestice uzorka jer su postupci pridobivanja izbijeljenih drvnih vlakana i izoliranja holoceluloze već degradirali strukturu uzorka u većoj mjeri no što su to činile smjese otopina u procesu ekstrakcije. Osim toga vidljiv je utjecaj različitih pH vrijednosti na sam proces enzimatske hidrolize. Razlike u prosjeku iznose 0,9%. To se čini kao bizarna razlika. No, ukoliko se vratimo na proračun kvantitativnog iskorištenja drva u procesu enzimatske hidrolize možemo zaključiti kako razlika u pH vrijednosti od samo 0,5 može rezultirati gubitkom od gotovo 1 kg D-glukoze. Budući da se u velikim industrijama teži za što većim iskorištenjem koje znači i veći profit, u kreiranju procesa enzimatske hidrolize drva crne topolovine (*Populus nigra* L.) treba obratiti pažnju na pH vrijednost otopine.

6.3.4. Utjecaj prisutnosti lignina na proizvode enzimatske hidrolize

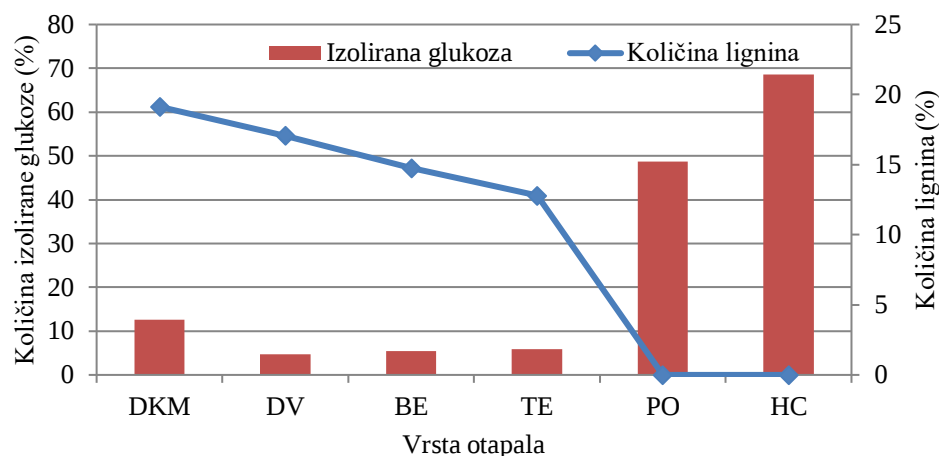
Budući lignin i celuloza čine najveći udio stanične stijenke drva, pretpostavlja se kako lignin ima značajnu ulogu na mogućnost degradacije celuloze. Stoga naredne slike prikazuju dobivene rezultate ispitivanja utjecaja količine lignina u uzorcima na proizvode enzimatske hidrolize.



Slika 24. Odnos koncentracije D-glukoze u supernatantu i količine lignina u uzorku

Slika 24. prikazuje odnos koncentracije D-glukoze u supernatantu i kretanja količine lignina u uzorcima. Kao i u prethodnim slučajevima usporedbe, koncentracija glukoze se ne može dovesti u odnos s količinom lignina u uzorku drva.

Suprotno prethodno analiziranom utjecaju lignina na koncentraciju D-glukoze u supernatantu, slika 25. prikazuje utjecaj količine lignina na količinu izolirane D-glukoze. Naime na grafičkom prikazu može se uočiti kako uzorci bez prisutnosti lignina dostižu više desetaka veće vrijednosti količine izolirane D-glukoze. Ovaj podatak nam zapravo govori kako prilikom kreiranja procesa prerade drva za dobivanje D-glukoze trebamo isključiti sve procese predobrade drva koji ne uklanjaju lignin iz uzoraka koje će se kasnije hidrolizirati.



Slika 25. Utjecaj količine lignina u uzorcima na količinu izolirane D-glukoze

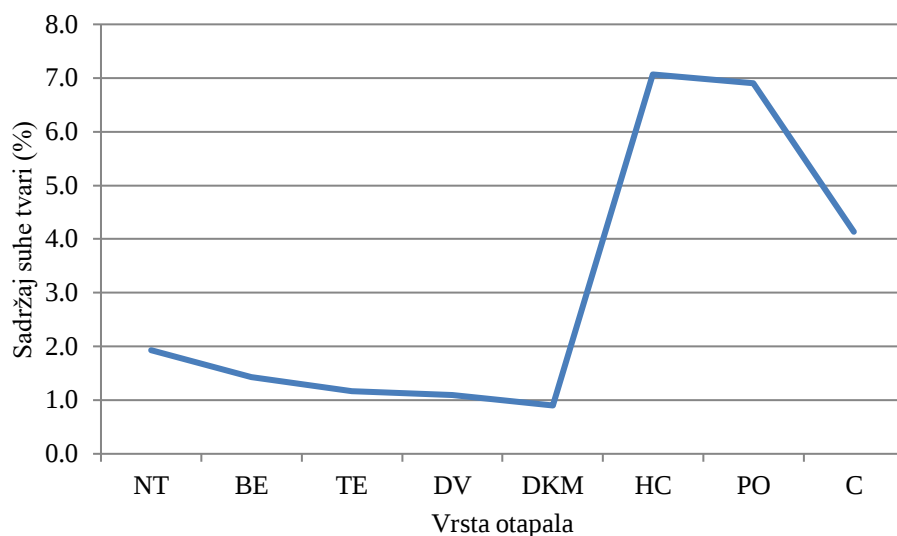
6.3.5. Određivanje suhe tvari u supernatantu

Prikazana tablica 10 prikazuje rezultate količine suhe tvari u supernatantu enzimatske hidrolize. Brixova skala ukazuje na količinu šećera poput fruktoze, saharoze i glukoze u otopini koja se ispituje. Često je korištena mjera u prehrambenoj industriji. Promatrajući srednje vrijednosti sadržaja suhe tvari u uzorcima, a u odnosu na metode predobrade uzoraka može se zaključiti kako metode ekstrakcije akcesornih tvari rezultiraju manjim vrijednostima količine suhe tvari nego metode za pridobivanje holoceluloze, izbijeljenih drvnih vlakana i celuloze. Standardna devijacija srednjih vrijednosti suhe tvari kod metoda ekstrakcije ukazuje na to kako ne postoji veliko odstupanje u vrijednostima te da te metode ne utječu na vrijednost količine suhe tvari u otopini.

Tablica 10. Rezultati određivanja suhe tvari u supernatantu

Broj uzorka	Količina suhe tvari u supernatantu (%)							
	NT	BE	TE	DV	DKM	HC	PO	C
1	2,0	1,4	1,2	1,1	0,9	7,1	6,9	4,1
2	1,9	1,5	1,1	1,1	0,9	7,0	6,9	4,2
3	1,9	1,4	1,2	1,1	0,9	7,1	6,9	4,1
Sr.vr.	1,9	1,4	1,2	1,1	0,9	7,1	6,9	4,1
Stand. dev.	0,399					1,648		

U tablici 10. NT označava ne tretirane uzorke, BE uzorke ekstrahirane smjesom otapala benzen-etanol, TE uzorke ekstrahirane smjesom otapala toluen-etanol, DV uzorke ekstrahirane destiliranom vodom, DKM uzorke ekstrahirane diklorometanom, HC uzorke holoceluloze, PO uzorke izbijeljenih drvnih vlakana i C uzorke celuloze.



Slika 26. Ovisnost količine suhe tvari u supernatantu o metodi predobrade uzoraka

Na slici 26. prikazan je grafički prikaz kretanja količine suhe tvari u supernatantu u ovisnosti o vrsti otapala tj. metodi predobrade uzorka. Ovaj prikaz je dodatna potvrda teze da različite metode predobrade uzoraka u svrhu izoliranja akcesornih tvari ne doprinose optimizaciji procesa enzimatske hidrolize. Još jednom možemo potvrditi tezu kako je potrebno ukloniti lignin u što većoj mjeri kako bi se ostvario što veći sadržaj suhe tvari u supernatantu.

7. ZAKLJUČAK

Sukladno postavljenim ciljevima, planu istraživanja i rezultatima dobivenima istraživanjem iznose se sljedeća zaključna 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,
- kod ekstrakcije akcesornih tvari benzen treba zamijeniti toluenom u otopini benzen-etanol zbog toksičnosti benzena i njegovog trajnog utjecaja na zdravlje,
- različite metode predobrade drva utječu na sadržaj lignina u uzorcima,
- za postizanje visoke koncentracije D-glukoze potreban je sadržaj vode u rasponu 8-12%,
- različite metode ekstrakcije drva ne utječu značajno na koncentraciju D-glukoze,
- najveća masa D-glukoze i najviše kvantitativno iskorištenje drva dobiva se iz uzoraka koji u sebi ne sadrže lignin,
- najveće iskorištenje ostvaruje se prilikom hidrolize holoceluloze,
- koncentracija otopljene D-glukoze ne ovisi o količini lignina niti masa izolirane glukoze ne ovisi o koncentraciji iste u otopini,
- niža pH vrijednost rezultira većom degradacijom ulaznog uzorka tj. manjim krutim ostatkom po završetku procesa,
- za dobivanje što veće količine D-glukoze potrebno je što je maksimalno moguće ukloniti lignin iz uzorka, smanjenjem količine lignina raste kvantitativno iskorištenje drva u vidu D-glukoze,
- uzorci prethodno obrađeni metodom koja uklanja lignin ostvaruju veću količinu suhe tvari u otopini po završetku hidrolize,
- potrebno je obaviti detaljna istraživanja koja bi obuhvaćala samo metode dobivanja holoceluloze, celuloze i drvnih vlakana kako bi se decidirano ustanovilo koja od te tri metode predobrade ostvaruje najbolje kvalitativne i kvantitativne rezultate te koja bi potencijalno financijski bila najisplativija.

LITERATURA

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

Chaffey, N., 2002.: Wood Microscopical Techniques, Wood Dormation In Trees: Cell and Molecular Biology Techniques, CRC Press, Boca Raton, pp. 23-24.

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

Diaz-Pontones, D.M.; Garcia-Lara, S., 2000.: Deposit of galactomannan during endosperm development of *Ipomoea purpurea* (L) RothPhyton, B. Aires, 66, 9-14

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: Anatomical Properties of Three Lesser Utilised Ghanaian Hardwood Species, Wood-Chemistry, Ultrastructure, Reactions, verlag Kessel, Remagen, Germany

Fengel, D.; Wegener, G., 2003: Genetic variation of Norway spruce clones regarding their natural durability, physical and chemical propertiesWood—Chemistry, ultrastructure, reactions. Verlag Kessel, Remagen

Johnson, D.B., Moore, W.E.; Zank, L.C., 1961.: The Spectrophotometric Determination of Lignin in Small Wood Samples. Tappi, 44, 793-798.

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.

Limayem, A.; Ricke, S.C., 2012.: Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production: Current Perspectives, Potential Issues and Future Prospects. Progress in Energy & Combustion Science, 38, 449-467.

Lundmark, R.; Forsell, N.; Leduc, S.; Lundgren, J.; Ouraich, I; Pettersson, K.; Wetterlund, E., 2018., Large- scale implementation of biorafineries. New value chains, products and efficient biomass feedstock utilisation

Meyer, K.H.; Misch, L., 1937. : Positions des atomes dans le nouveau modèle spatial de la cellulose. *Helvetica Chimica Acta*, 20(1), pp.232-244.

Morales-de-laRosa, 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., 2005a: Determination of ash in biomass. Laboratory analytical procedure. National renewable energy laboratory. 1-5.

Sluiter, A.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D., 2005b: 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.

Stanešić, J.; Podvorec, T. 2018.: Utjecaj količine kompleksa enzima i natrijeva azida (NaN_3) na proces i proizvode enzimatske hidrolize celuloze iz drva crne topole (*Populus nigra* L.); Rad nagrađen Rektorovom nagradom u akademskoj godini 2017./2018.

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

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

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

Torget, R.; Himmel, M.; Grohmann, K., 1992.: Dilute acid pretreatment of two short-rotation herbaceous crops, Appl. Biochem. Biotechnol., 34/35, 115-123.

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

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

ISO 3310-1: 2016 Test sieves – Technical requirements and testing

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

TAPPI T264 CM-97 Preparation of Wood for Chemical Analysis

TAPPI 211 om-02 Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C

TAPPI T222 om-06: Acid-insoluble lignin in wood and pulp (Reaffirmation of T 222 om-02)

URL 1: <http://biomassmagazine.com/articles/15533> , 25.08.2018.

URL 2: <https://www3.hhu.de/biodidaktik/zucker/sugar/glukose.html>, 20.08.2018.

URL 3: <http://www.plantea.com.hr/crna-topola>, 10.07.2018.