

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ

Јована З. Грбић

БИОТЕХНОЛОШКА ВАЛОРИЗАЦИЈА  
ФРАКЦИЈА ЛИГНОЦЕЛУЛОЗНЕ БИОМАСЕ  
ДОБИЈЕНИХ КОМБИНОВАНИМ  
ТРЕТМАНИМА НЕТЕРМАЛНОМ ПЛАЗМОМ

докторска дисертација

Београд, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Jovana Z. Grbić

BIOTECHNOLOGICAL VALORISATION OF  
LIGNOCELLULOSIC BIOMASS FRACTIONS  
OBTAINED BY COMBINED NON-THERMAL  
PLASMA TREATMENTS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026.



## ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација је урађена на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију, Технолошко-металуришког факултета Универзитета у Београду.

Неизмерну захвалност дугујем својој менторки, др Александри Ђукић-Вуковић, доценту Технолошко-металуришког факултета, која је препознала истраживачки потенцијал у мени и увела ме у свет науке. Посебно сам јој захвална на несебичном дељењу свог огромног знања и искустава, који су често превазилазили оквире ове дисертације, али и значајно допринели мом развоју. Такође, захваљујем јој на корисним саветима, пре свега стручним, али и животним, као и на указаном поверењу и пруженој прилици да успешно сарађујемо већ дуги низ година. Њено разумевање, подршка, стрпљење, труд и увек ведар дух учинили су да израда ове дисертације буде право задовољство. Велика је част и привилегија бити докторанд таквог ментора! Драга Сашка, хвала на свему!

Велику захвалност дугујем и свом другом ментору, др Саши Лазовићу, научном саветнику Института за физику, пре свега на помоћи око разумевања концепта нетермалне плазме и увођењу у потпуно нову област, са којом нисам имала прилику да се сретнем раније. Такође, захвална сам му и на корисним сугестијама и корекцијама током писања заједничких радова, као и ове дисертације, који су значајно допринели обликовању мог схватања науке и истраживања.

Проф. др Љиљани Мојовић сам посебно захвална на жељи да остане укључена у мој истраживачки рад и током докторских студија и тиме заокружимо причу која је започела још на основним студијама. Искрено Вам захваљујем и на знању и искуству које сте пренели Александри, а које је она применила у свом менторству на најбољи могући начин. Захваљујем се и проф. др Зорици Кнежеввић-Југовић и проф. др Маји Вукашиновић-Секулић на сарадњи и учествовању у финалном обликовању ове дисертације, чиме је њен квалитет значајно унапређен.

Део истраживања у оквиру ове дисертације је урађен на Факултету за архитектуру, изградњу и грађевинарство Лофборо универзитета (Уједињено Краљевство), у оквиру међународног колаборативног истраживачког пројекта SparkGREEN (ANSO-CR-PP-08-2022). Велику захвалност дугујем проф. др Тањи Раду, редовном професору Лофборо универзитета, на гостопримству, помоћи и корисним саветима, као и на свим лепим тренуцима током мог боравка тамо. Такође, захвална сам и проф. др Хемаки Бандуласени, ванредном професору Департмана за хемијско инжењерство Лофборо универзитета, који ми је омогућио употребу плазма реактора и помогао при скалирању третмана развијених у оквиру ове дисертације.

Посебну захвалност дугујем колегиници из тима, др Драгани Младеновић, нарочито на помоћи у постављању експерименталних темеља ове дисертације. Захвална сам јој и на саветима и значајном доприносу у дефинисању и обликовању ове дисертације. Такође, велику захвалност дугујем и колеги из тима, Михајлу Богдановићу, на подршци и речима охрабрења током свих ових година, а нарочито на техничкој помоћи и „чврстој руци“ кад год ми је била потребна.

Захваљујем се и драгим колегама и професорима Катедре за биохемијско инжењерство и биотехнологију на сарадњи, помоћи и дружењу. Нарочито хвала екипи из поподневне смене, а пре свега др Слађани Давидовић, на одржавању доброг расположења и мотивације, као и на свим драгоценим саветима. Такође, посебно сам захвална колегиници др Невени Илић на подршци и помоћи у експерименталном раду. Радујем се наставку наше сарадње! Велико хвала и др Милицы Вељковић на помоћи у анализи узорака.

Захвалност дугујем и колегама са других катедри Технолошко-металуришког факултета Универзитета у Београду, а пре свега проф. др Душану Мијину, др Славици Лазаревић и др Ивони Частван-Јанковић, који су ми несебично помогли у анализирању узорака. Детаљну анализу, уз пријатну сарадњу су ми омогући и др Миливој Радојчин, редовни професор

*Пољопривредног факултета Универзитета у Новом Саду, др Стева Левић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Стеван Стојадиновић, редовни професор Физичког факултета Универзитета у Београду, др Стефан Павловић, научни сарадник Института за хемију, технологију и металургију Универзитета у Београду, др Валентина Семенченко-Николић, виши научни сарадник Института за кукуруз Земун Поље и др Александра Машуловић, научни сарадник Института за нанонауку и материјале Арагон (Шпанија), на чему сам им веома захвална.*

*Највећу захвалност дугујем својој породици и малом кругу великих људи, на безусловној љубави, разумевању и подршци које ми пружа читав живот. Хвала вам што сте увек веровали у мене и помогли ми да докажем да је све могуће када се потрудиш!*

*Јована*

*„Увек делује немогуће, све док се не уради.“ – Нелсон Мандела*

## **Биотехнолошка валоризација фракција лигноцелулозне биомасе добијених комбинованим третманима нетермалном плазмом**

### **САЖЕТАК**

Пољопривредни остаци, који по свом саставу спадају у лигноцелулозну биомасу, чине најзаступљенију групу биоразградивог отпада. Захваљујући високом садржају угљеника и ароматичних једињења, ови остаци се могу користити као сировина за производњу биогорива и високо вредних производа, попут млечне киселине. Предмет истраживања ове дисертације је развијање и оптимизација третмана лигноцелулозне биомасе у циљу постизања ефикасне делигнификације и добијања што чистијих фракција које се даље могу валоризовати. Развијени третмани су засновани на примени нетермалне плазме као извора реактивних врста које доприносе разградњи лигноцелулозе у складу са циљевима и принципима одрживог развоја. Развијен је третман кукурузне стабљике нетермалном плазмом у воденој средини, као и конвенционални третмани (Фентон, алкални, ензимски и третман еутектичким смешама) потпомогнути плазмом. Добијене фракције су окарактерисане са хемијског, структурног и морфолошког аспекта. Целулозна фракција је валоризирана кроз млечно-киселинску и алкохолну ферментацију и анаеробну дигестију. Биолошка активност лигнинских фракција процењена је испитивањем антиоксидативне и антимицробне активности. Највећи степен делигнификације остварен је током плазма/алкалног третмана и плазма/еутектичке смеше третмана. Целулозне фракције изоловане након ових третмана су подвргнуте ферментационим процесима и дигестији. Добијени приноси млечне киселине, етанола и биометана потврдили су да се применом поменутих третмана може постићи ефикаснија валоризација биомасе у односу на употребу сирове биомасе. Развијени третмани имају висок степен ефикасности, а при нижим температурама и краћим дужинама трајања од конвенционалних третмана, и отварају спектар нових могућности за успостављање биорафинеријских поступака на лигноцелулози.

**Кључне речи:** *кукурузна стабљика, нетермална плазма, плазма игла, делигнификација, биорафинерија, ферментација, анаеробна дигестија, млечна киселина, биоетанол, биометан*

**Научна област:** Технолошко инжењерство

**Ужа научна област:** Биохемијско инжењерство и биотехнологија

# **Biotechnological Valorisation of Lignocellulosic Biomass Fractions Obtained by Combined Non-thermal Plasma Treatment**

## **ABSTRACT**

Agricultural residues, which represent lignocellulosic biomass by their composition, are the most common biodegradable waste. Due to the high content of carbon and aromatic compounds, these residues can be used as a resource for producing biofuels and value-added products, such as lactic acid. This dissertation aims to develop and optimise lignocellulosic biomass treatments to achieve efficient delignification and obtain pure fractions that could be further valorised. The developed treatments used non-thermal plasma as a source of reactive species, which could promote lignocellulose degradation following the sustainable development goals and principles. Non-thermal plasma treatment of corn stalk in water, and a set of conventional treatments (Fenton, alkaline, enzymatic, and deep eutectic solvent treatment) combined with plasma were developed. Obtained fractions were characterised chemically, structurally, and morphologically. Cellulose fraction was valorised through lactic acid fermentation, alcoholic fermentation, and anaerobic digestion. The biological activity of the lignin fraction was estimated by determining antioxidative and antimicrobial activity. The highest delignification rate was achieved during plasma/alkaline treatment and plasma/eutectic solvent treatment. Cellulose fractions isolated after these treatments were subjected to fermentation processes and digestion. Obtained yields of lactic acid, ethanol and biomethane confirmed that applying the mentioned treatments promoted biomass valorisation compared to the raw biomass. Developed treatments possess high efficiency rates at lower temperatures and shorter times than conventional treatments, opening up a spectrum of opportunities for establishing biorefinery processes on lignocellulose.

**Keywords:** *corn stalk, non-thermal plasma, plasma jet, delignification, biorefinery, fermentation, anaerobic digestion, lactic acid, ethanol, biogas*

**Scientific field:** Technological Engineering

**Scientific subfield:** Biochemical Engineering and Biotechnology

# САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО .....	4
2.1. Биорафинеријски поступци - појам, особине и улога .....	4
2.2. Лигноцелулозна биомаса.....	6
2.2.1. Хемијска структура.....	6
2.2.2. Кукуруз и кукурузна стабљика .....	10
2.3. Третмани лигноцелулозне биомасе .....	13
2.3.1. Физички третмани .....	14
2.3.2. Хемијски третмани .....	19
2.3.3. Физичко-хемијски третмани .....	22
2.3.4. Биолошки третмани.....	24
2.3.5. Напредни оксидациони процеси .....	27
2.3.6. Неконвенционални третмани.....	29
2.4. Појам гасне плазме .....	32
2.4.1. Третман нетермалном плазмом .....	33
2.4.2. Плазма активирана вода .....	34
2.4.3. Третман лигноцелулозне биомасе нетермалном плазмом .....	38
2.5. Валоризација лигноцелулозне биомасе.....	41
2.5.1. Производња млечне киселине .....	42
2.5.2. Производња биоетанола.....	46
2.5.3. Производња биометана .....	47
2.6. ПРЕДМЕТ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....	52
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО .....	53
3.1. МАТЕРИЈАЛИ И ОПРЕМА .....	53
3.2. ИЗВОРИ НЕТЕРМАЛНЕ ПЛАЗМЕ .....	56
3.3. ПРИПРЕМА БИОМАСЕ .....	58
3.4. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПЛАЗМА АКТИВИРАНЕ ВОДЕ.....	59
3.4.1. Одређивање концентрације водоник пероксида .....	59
3.4.2. Одређивање концентрације јона нитрата и нитрита .....	60
3.4.3. Одређивање концентрације хидроксил радикала .....	60
3.5. ТРЕТМАНИ БИОМАСЕ .....	61
3.5.1. Комбиновани нетермална плазма/вода третман .....	61
3.5.2. Комбиновани нетермална плазма/Фентон третман .....	61
3.5.3. Комбиновани нетермална плазма/алкални третман .....	63
3.5.4. Комбиновани нетермална плазма/природне дубоке еутектичке смеше третман.....	63
3.5.5. Комбиновани нетермална плазма/ензимски третман.....	66
3.5.5.1. Одређивање активности манган пероксидазе .....	66
3.5.5.2. Одређивање концентрације протеина .....	67
3.6. ЕНЗИМСКА ХИДРОЛИЗА БИОМАСЕ .....	68
3.6.1. Одређивање концентрације хексоза и пентоза.....	68
3.6.2. Одређивање концентрације редукујућих шећера .....	69
3.7. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БИОМАСЕ .....	70
3.7.1. Одређивање садржаја влакана .....	70
3.7.2. Одређивање садржаја структурних угљених хидрата и лигнина.....	73
3.7.3. Одређивање садржаја лигнина растворљивог у ацетил бромиду .....	76
3.7.4. Одређивање антиоксидативне активности лигнинске фракције.....	77
3.7.5. Одређивање концентрације укупних полифенола у лигнинској фракцији .....	78
3.7.6. Одређивање антимицробне активности лигнинске фракције.....	79
3.7.7. Одређивање садржаја укупних и испарљивих чврстих материја.....	80

3.7.8. Елементарна органска микроанализа .....	80
3.7.9. Одређивање бруто садржаја топлотне енергије.....	80
3.7.10. Диференцијално бојење .....	81
3.7.11. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR).....	81
3.7.12. Раман спектроскопија.....	81
3.7.13. Скенирајућа електронска микроскопија (SEM).....	82
3.7.14. Течна хроматографија високих перформанси (HPLC).....	82
3.7.15. Порозиметрија са интрузијом живе (MIP) .....	82
3.7.16. Рендгенска дифракциона анализа (XRD) .....	82
3.8. ВАЛОРИЗАЦИЈА ТРЕТИРАНЕ БИОМАСЕ .....	83
3.8.1. Млечно-киселинска ферментација.....	83
3.8.1.1. Одређивање концентрације млечне киселине .....	83
3.8.1.2. Одређивање броја живих ћелија .....	85
3.8.2. Алкохолна ферментација.....	85
3.8.2.1. Одређивање концентрације биоетанола.....	86
3.8.3. Анаеробна дигестија.....	86
3.8.3.1. Биохемијски потенцијал метана .....	86
3.8.3.2. Теоријски биохемијски потенцијал метана и индекс биодеградабилности .....	87
3.9. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ РЕЗУЛТАТА.....	88
3.10. ПРОЦЕНА ЕКОНОМСКИХ И ЕКОЛОШКИХ АСПЕКТА ПРИМЕЊЕНИХ ТРЕТМАНА .....	88
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....	89
4.1. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА КУКУРУЗНЕ СТАБЉИКЕ.....	89
4.2. ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПЛАЗМА АКТИВИРАНЕ ВОДЕ.....	92
4.3. КОМБИНОВАНИ НЕТЕРМАЛНА ПЛАЗМА/ВОДА ТРЕТМАН .....	94
4.4. КОМБИНОВАНИ НЕТЕРМАЛНА ПЛАЗМА/ФЕНТОН ТРЕТМАН.....	98
4.5. КОМБИНОВАНИ НЕТЕРМАЛНА ПЛАЗМА/АЛКАЛНИ ТРЕТМАН .....	105
4.6. КОМБИНОВАНИ НЕТЕРМАЛНА ПЛАЗМА/ПРИРОДНЕ ДУБОКЕ ЕУТЕКТИЧКЕ СМЕСЕ ТРЕТМАН .....	119
4.7. КОМБИНОВАНИ НЕТЕРМАЛНА ПЛАЗМА/ЕНЗИМСКИ ТРЕТМАН .....	131
4.8. ВАЛОРИЗАЦИЈА ТРЕТИРАНЕ БИОМАСЕ .....	133
4.8.1. Млечно-киселинска ферментација.....	133
4.8.2. Алкохолна ферментација.....	134
4.8.3. Анаеробна дигестија.....	136
4.9. ПРОЦЕНА ОДРЖИВОСТИ РАЗВИЈЕНИХ ТРЕТМАНА .....	138
5. ЗАКЉУЧАК.....	140
6. ЛИТЕРАТУРА .....	143

# 1. УВОД

Индустријски развој, интензификација пољопривредне производње, демографска експанзија и начин живота током последњих неколико деценија довели су до стварања великих количина отпада. На глобалном нивоу се годишње произведе око две милијарде тона комуналног отпада, што износи око 0,74 kg отпада по становнику произведеног у једном дану. Око 37% комуналног отпада се одлаже на санитарне депоније са контролисаним прикупљањем тзв. „депонијског“ гаса богатог метаном, који настаје током разградње депонованог отпада. Чак 33% комуналног отпада одлаже се на несанитарне, отворене депоније, у којима нема контроле над насталим депонијским гасом. [1] Пољопривредни остаци, заједно са остацима из прехранбене индустрије, заостају у 4,5 пута већим количинама од комуналног отпада, са око 3,35 kg отпада произведеног по становнику у једном дану. Неадекватно одлагање овог отпада доводи до емисије великих количина гасова са ефектом стаклене баште (енгл. *greenhouse gases, GHG*). На светском нивоу је током 2022. године забележена укупна емисија GHG од 1 281 260 kt еквивалента угљеник (IV) оксида ( $\text{CO}_{2\text{eq}}$ ), која потиче само од система агро-прехранбена индустрија. У Републици Србији ове емисије износе око 1 634 kt  $\text{CO}_{2\text{eq}}$  [2]. Како би се климатске промене изазване емисијом великих количина GHG у атмосферу држале под контролом, развијене су бројне стратегије за управљање отпадом и емисијама GHG, са циљем очувања животне средине.

Крајем XX века, Конвенција Уједињених нација о промени климе усвојила је „Кјото протокол“, као први споразум чији је циљ било ограничавање емисија GHG [3]. Након тога, Европска комисија је постигла „Европски зелени договор“ (енгл. *European green deal*), обавезујући земље чланице да смање емисије GHG за 50% до 2030. године, како би Европа до 2050. године постала први климатски неутралан континент [4]. Истовремено, Уједињене нације су кроз „Агенду одрживог развоја 2030“ дефинисале циљеве одрживог развоја (енгл. *Sustainable Development Goals, SDG*), кроз које се проблеми везани за климатске промене сагледавају и превазилазе са више аспеката [5]. Да би се задати циљеви постигли, неопходно је прећи са линеарног, „ресурси-производња-одлагање“ модела економије, на циркуларни, „производња-коришћење-сепарација-рециклажа-производња“ модел економије [6]. Овај прелазак се може постићи имплементацијом биорафинеријских поступака.

Биорафинерија се заснива на коришћењу биомасе као сировине за добијање енергије и производа са додатом вредношћу поступцима који су у складу са принципима одрживог развоја. Према директиви EU 2003/30/ЕС, биомасу чине биоразградиви делови производа, отпада или остатака из пољопривреде, шумски отпад и отпад сродних индустрија, као и биоразградиви делови индустријског и градског отпада [7]. У зависности од типа сировине која се користи, постоји неколико врста биорафинерије – лигноцелулозна биорафинерија, биорафинерија на бази целих биљака, зелена биорафинерија, биорафинерија на бази морске и шумске биомасе, као и конвенционална биорафинерија, која користи скроб и шећер у постојећим индустријским поступцима [8]. Процењује се да укупне резерве биомасе на копну износе око 1,8 трилиона тона, док је у воденим површинама присутно око 4 милијарде тона [9]. Лигноцелулозна биомаса, са око 200 милијарди тона годишње произведених на светском нивоу, представља најраспрострањенији и најзаступљенији тип биомасе [10]. Пољопривредну лигноцелулозну биомасу чине делови биљака, пре свега житарица, који заостају након убирања јестивих делова. Упркос прописаним нормама, велика количина остатака заосталих након жетве се и даље уклања са обрадивих површина спаљивањем, емитујући 37 553 kt  $\text{CO}_{2\text{eq}}$  годишње [2]. Укључивањем лигноцелулозне биомасе у биорафинеријске поступке могу се смањити емисије штетних гасова, а самим тим и негативан утицај на животну средину. Њеном прерадом не долази до повећања емисија угљеник (IV) оксида у атмосферу, јер је у питању биогени угљеник (IV) оксид који биљке користе у свом метаболизму. Осим тога, коришћењем лигноцелулозне биомасе као сировине у биорафинеријским поступцима уместо биљака које се

користе као храна, попут кукуруза, истовремено се решава и проблем компетиције биорафинерије са производњом хране. Употреба овог типа биомасе је повољнија и са економског аспекта, а из ње се могу се произвести хемијска једињења са знатно нижим угљеничним отиском, односно хемијска једињења произведена из обновљивих извора.

Лигноцелулоза се састоји из три главне компоненте – целулозе, хемицелулозе и лигнина, што је чини богатим извором шећера и ароматичних једињења. Као таква, лигноцелулозна биомаса се може користити као сировина за добијање различитих облика енергије, попут биоетанола и биометана, али и полупроизвода и готових производа, попут млечне киселине, фурфурала, полифенола, ђубрива, биоматеријала, фармацеутика, нутрицеутика, биоактивних једињења, итд. [8,11]. Међутим, због своје комплексне хемијске структуре и снажних веза међу полимерима, неопходан корак у сваком биорафинеријском поступку је третман биомасе. Развијене су бројне физичке, хемијске и физичко-хемијске методе за третман биомасе, са циљем њеног фракционисања и бољег искоришћења. Иако су ефикасне у разградњи лигноцелулозе, конвенционалне методе за третман биомасе су често енергетски и хемијски интензивне. Током ових третмана неретко долази до формирања споредних производа који инхибиторно делују на микроорганизме и ензиме у даљим корацима валоризације. Такође, реагенси који се користе у хемијским методама могу имати неповољан утицај на животну средину, а њихово правилно третирање и одлагање након третмана подразумева додатан утрошак енергије, воде и значајне инвестиције, чинећи их неодрживим. Стога се ради на развијању нових третмана веће ефикасности, а у складу са принципима одрживог развоја. Предмет истраживања ове дисертације је развијање нових третмана лигноцелулозне биомасе заснованих на примени нетермалне плазме.

Третман нетермалном плазмом заснива се на електричном пражњењу у гасу, при којем се, поред осталог, стварају реактивне врсте, попут радикала, јона, побуђених и неутралних молекула. Различите конфигурације нетермалне плазме могу се користити као извор кисеоничних реактивних врста ( $O_3$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  и др.) и азотних реактивних врста ( $NO_x$ , нитрати, нитрити и др.). Ове врсте имају способност да разграде C-C, C-H и C-O везе присутне у лигнину, чиме се целулозна и хемицелулозна компонента ослобађају [12]. Тип реактивних врста и њихов механизам деловања на структуру лигноцелулозе зависе од више фактора – конфигурације нетермалне плазме, типа употребљених електрода и састава доводног гаса, дужине трајања третмана, растојања извора од површине третираног материјала, итд. Када се нетермална плазма користи самостално, ефикасно уклањање лигнина из третиране биомасе захтева велики утрошак енергије, те се у реакциону смешу додају различити катализатори који поспешују настајање реактивних врста [13]. Са друге стране, конвенционални третмани се углавном изводе на повишеним температурама (изнад  $100\text{ }^\circ C$ ), у дужим временским интервалима, често уз додатак великих количина реагенса. Стога је циљ ове дисертације развој третмана лигноцелулозне биомасе са нетермалном плазмом, како би се повећала ефикасност делигнификације и добиле чистије фракције лигноцелулозе погодније за биотехнолошку примену.

Фракције лигноцелулозе изоловане након третмана могу се користити у биорафинеријским поступцима за добијање различитих производа са додатом вредношћу, у зависности од њихових карактеристика. Комбиновани третмани развијени у оквиру ове дисертације су најпре оптимизовани у циљу постизања највећег степена делигнификације третиране биомасе. Након третмана изоловане су целулозна, хемицелулозна и лигнинска фракција. Добијене фракције су окарактерисане са аспекта хемијских, морфолошких и структурних промена узрокованих примењеним третманима. Затим је уследила валоризација одабраних узорака у поступцима млечно-киселинске ферментације, алкохолне ферментације и анаеробне дигестије. На овај начин су развијени третмани и извршена је процена погодности употребе третиране биомасе као полазне сировине за добијање високо вредних производа, односно за производњу енергије. Као модел супстрат коришћена је кукурузна стабљика, која је међу најзаступљенијим сировинама типа пољопривредне лигноцелулозне биомасе. Проналазак ефикасних третмана је један од критичних корака и изазова да би се омогућило

шире коришћење пољопривредне лигноцелулозне биомасе као сировине за биорафинеријске поступке и унапређење циркуларне биоекономије.

## 2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

### 2.1. Биорафинеријски поступци - појам, особине и улога

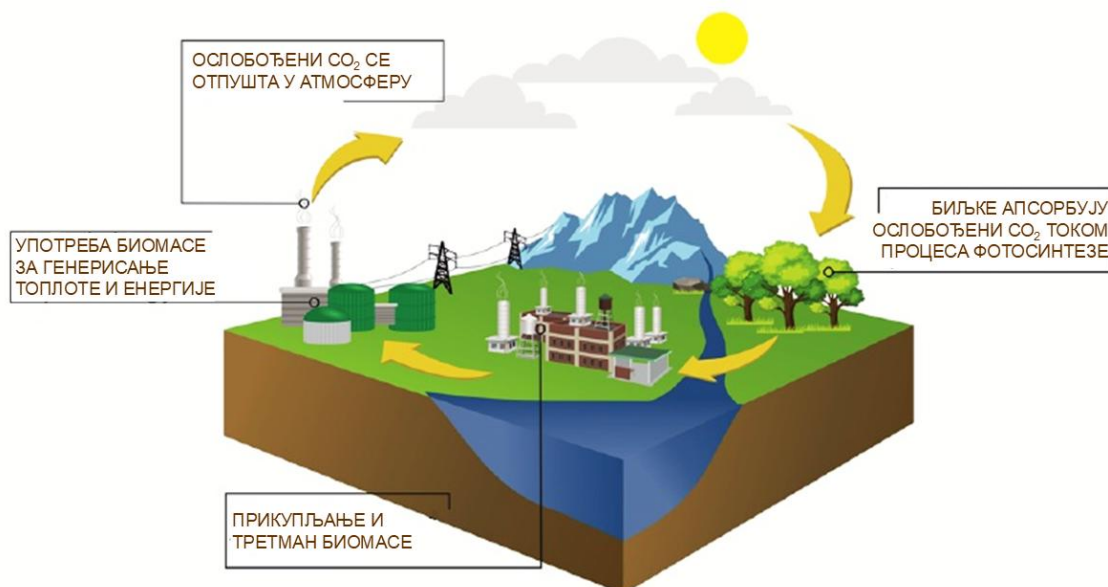
Према дефиницији Међународне агенције за енергију (енгл. *International Energy Agency*), биорафинерија представља превозиње биомасе у енергију и производе комерцијалне вредности у складу са принципима одрживог развоја [14]. Под појмом „биорафинерија“ подразумева се постројење, процес, фабрика или читав скуп постројења, те у складу са тим постоји више типова биорафинерије. Заједнички принцип свих типова биорафинерије је одрживост, односно оправданост са еколошког, економског и социјалног аспекта. Комерцијална вредност подразумева постојање одговарајућег тржишта за пласирање добијених производа, било састојка хране или хране за животиње, реагенаса, материјала или неког облика биоенергије [15].

На основу технологије на којој се биорафинерија заснива, разликују се конвенционална (нпр. ферментација шећерних и скробних сировина) и напредна биорафинерија, која подразумева обраду алтернативних сировина новијим техникама, као и биорафинерија прве, друге, односно треће генерације. Према типу сировине дели се на биорафинерију на бази целих биљака, олеохемијску биорафинерију, биорафинерију на бази лигноцелулозне биомасе, зелену биорафинерију и биорафинерију на бази морске биомасе. Одабрана сировина се може превести у жељени производ применом термохемијских поступака (нпр. пиролиза, гасификација) или биохемијских поступака (нпр. ферментација, ензимска конверзија). [16,17]

Биомаса која се може користити као сировина у биорафинеријским поступцима се према пореклу и типу може сврстати у:

- *сировине прве генерације*, које подразумевају јестиве сировине из пољопривредне производње (скробни, шећерни и уљани усеви, тзв. „уљарице“),
- *сировине друге генерације*, у које се убрајају нејестиве сировине, односно лигноцелулозна биомаса и биљни материјал заостао након процесуирања у пољопривреди, шумарству и прехранбеној индустрији,
- *сировине треће генерације*, којима припадају различите врсте ферментативних и фотосинтетичких бактерија и алги, и
- *сировине четврте генерације*, које представљају најмлађу групу сировина и подразумевају генетски модификоване микроорганизме (квасце, гљиве, микроалге и цијанобактерије) [18,19].

Лигноцелулозна биомаса, са око 200 милијарди тона годишње произведених на светском нивоу, представља најраспрострањенији и најзаступљенији тип биомасе [10]. Лигноцелулозну биомасу чине делови биљака, пре свега житарица, који заостају након убирања јестивих делова. Ови остаци се традиционално користе као храна за животиње, као извор топлотне енергије директним сагоревањем, а део пољопривредних остатака се може инкорпорирати у земљу ради амелиорације земљишта и припреме за наредну сетву. Употребом лигноцелулозне биомасе као сировине у биорафинеријским поступцима добија се низ полупроизвода и готових производа са додатом вредношћу, биогорива и енергије [20]. Могући начини валоризације лигноцелулозне биомасе биће детаљно анализирани у одељку 2.5. Примена лигноцелулозне биомасе као сировине у биорафинерији у односу на целе биљке је знатно повољнија са аспекта одрживости. Осим велике доступности, ова сировина је и јефтина, те је сам процес економски исплативији. Истовремено, не долази до конкуренције са производњом хране, нити је за њену производњу неопходно додатно заузимање обрадивих површина. Укључивањем лигноцелулозне биомасе у биорафинеријске поступке могу се смањити емисије штетних гасова, а самим тим и негативан утицај на животну средину. Њеном прерадом не долази до повећања емисија угљеник (IV) оксида у атмосферу, јер је у питању биогени угљеник (IV) оксид који биљке користе у свом метаболизму. Циклус кружења угљеника током производње и обраде биомасе приказан је на слици 2.1.



Слика 2.1. Циклус кружења угљеника током производње и обраде биомасе (преузето и прилагођено према [21])

Биорафинерија на бази пољопривредне лигноцелулозне биомасе се састоји из неколико фаза. Најпре се врши прикупљање сировине директно са њиве након жетве или из индустријског постројења, након уклањања јестивих делова биљке. Након тога, прикупљена биомаса се транспортује до биорафинеријског постројења. По пријему сировине, унутар биорафинеријског постројења врши се примарна обрада сировине, односно припрема за третман. Овај корак подразумева уситњавање на величину која омогућава даље руковање сировином. Такође, уколико је потребно, у овом кораку се може вршити додатна селекција сировине.

Третман биомасе представља најважнији корак у процесуирању сировине. Током третмана долази до разградње комплексне структуре лигноцелулозе и изоловање појединачних фракција које се даље могу преводити у жељене производе. Услови извођења третмана се најчешће дефинишу тако да у третираној биомаси заостаје највећа количина угљено-хидратне компоненте, док се лигнин раствара и касније рекуперирше из течне фракције након третмана. Третирана биомаса се затим хидролизује до простијих шећера, који се користе као супстрат за производњу биогорива, полупроизвода и готових производа. [22] Уколико се сировина, нетретирана биомаса подвргне ензимској хидролизи, приноси шећера ретко прелазе 20%. Применом адекватног третмана се принос шећера након хидролизе може повећати и до 90% [23]. Стога је неопходно одабрати одговарајући третман који ће задовољити потребе биорафинеријског поступка. У развоју нових третмана и биорафинеријских поступака важно је пратити у што већој мери принципе безбедности и одрживости кроз дизајн (енгл. *Safety and Sustainability by Design, SSbD*). Овај концепт је развијен од стране Обједињеног истраживачког центра (енгл. *Joint Research Centre, JRC*), како би се унапредио и стандардизовао процес иновација везаних за производњу хемикалија и материјала, а у складу са принципима циркуларне економије [24].

Тренутни проблеми и тзв. „уска грла“ биорафинерије на бази лигноцелулозне биомасе подразумевају [25]:

- избор и доступност сировине током читаве године;
- ефикасност примењеног третмана;
- капиталне и оперативне трошкове, односно трошкове реактора, опреме, реагенса и контроле процеса;
- настанак токсичних и инхибиторних једињења током третмана;
- кораке након третмана, односно испирање биомасе, њено неутралисање и сл.;
- отпадне токове настале током третмана и њихов утицај на животну средину;

- рекуперацију и даљу употребу/одлагање реагенаса и катализатора коришћених током третмана.

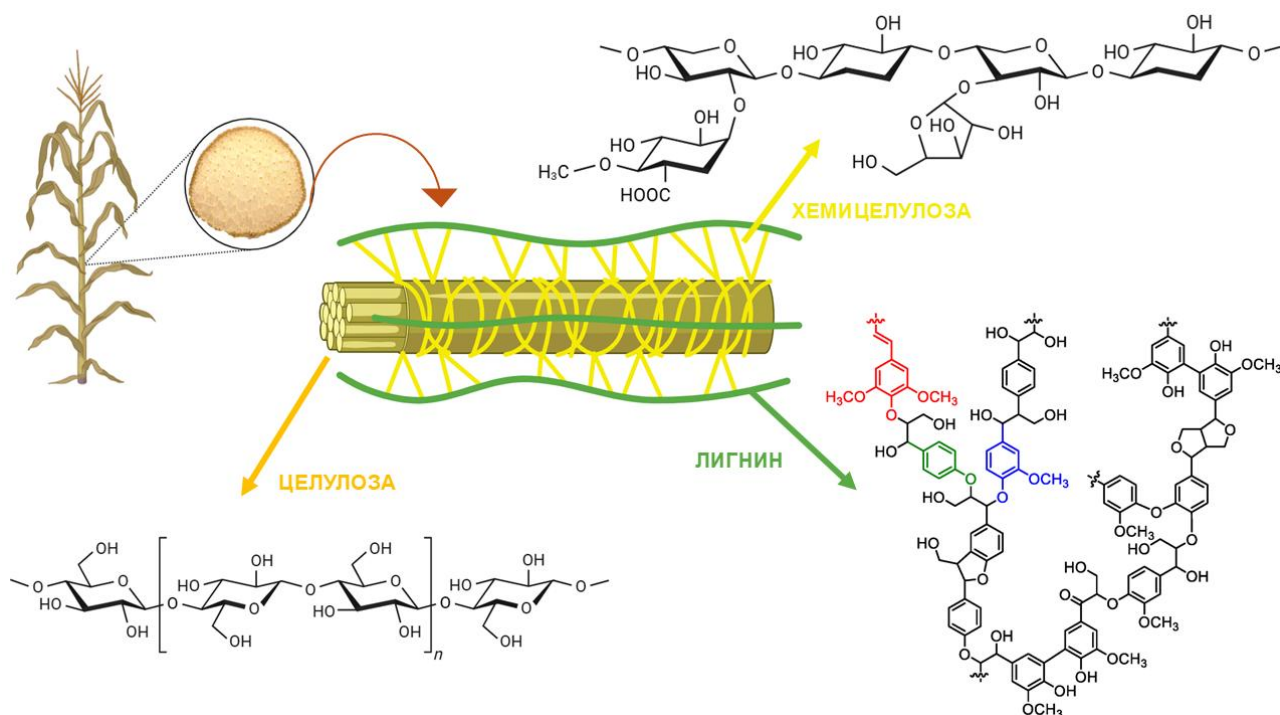
Наведени проблеми се могу превазићи адекватним одабиром третмана и процесних параметара, применом реактора једноставног дизајна и великог капацитета, минималном употребом реагенаса, уз могућност њиховог регенерисања након третмана, трошењем минималних количина воде и енергије, уз могућност поновне употребе кроз касније фазе процесуирања биомасе, као и максималним очувањем лигнина уклоњеног из биомасе и његовом применом за добијање високо вредних производа [25]. Након развијања поступка за третман и валоризацију биомасе и утврђивања његове ефикасности у разградњи лигноцелулозе, неопходно је спровести и техно-економску анализу развијеног поступка. Ова анализа обухвата процену трошкова који се односе на сировину, процесну опрему, реагенаса и енергију потребну за извођење поступка. Анализа се заснива на масеним и енергетским билансима самог процеса, који представљају важне параметре нарочито при преласку поступка са лабораторијског нивоа најпре на ниво пилот постројења, а затим и на индустријски комерцијални ниво. Такође, осим техно-економске анализе, пожељно је извршити и социо-економску анализу, односно проценити утицај развијеног поступка на животну средину и здравље људи. Нови биорафинеријски процеси се могу успоставити и даље развијати тек након детаљне процене наведених индикатора одрживости [26]. Биорафинерија на бази лигноцелулозе има позитивнији утицај на социо-економски аспект у поређењу са конвенционалним петрохемијским рафинеријама. Ова предност биомасе у односу на фосилне сировине заснована је пре свега на физичко-хемијским својствима лигноцелулозне биомасе.

## 2.2. Лигноцелулозна биомаса

Лигноцелулозна биомаса представља најраспрострањенији тип природних обновљивих сировина. Овај тип биомасе чине делови биљака, попут делова дрвета, различитих врста трава и жетвених остатака. Осим тога, овој групи припадају и органски делови комуналног отпада, у виду остатака од хране, папира и картона. Захваљујући великим количинама које се произведу сваке године, лигноцелулозна биомаса представља одличан избор сировине уколико се може имплементирати у биорафинеријске поступке. Међу сировинама на бази пољопривредне лигноцелулозе најзначајније и најзаступљеније су кукурузна стабљика, са годишњим обимом производње од око милијарду метричких тона, пиринчана стабљика, са приносом од 370-520 милиона тона годишње, багаса шећерне трске, са око 279 милиона метричких тона произведених годишње и отпад из производње папира, са око 40 милиона метричких тона чврстог отпада годишње [27]. Висок садржај угљених хидрата и ароматичних једињења који улазе у састав лигноцелулозне биомасе омогућава добијање више различитих типова производа полазећи од једне сировине, за разлику од нпр. скробних или уљаних сировина.

### 2.2.1. Хемијска структура

Лигноцелулозна биомаса се састоји из три основне компоненте – полисахарида целулозе и хемицелулозе и ароматичног полимера лигнина. Осим тога, у састав лигноцелулозне биомасе улазе и вода, протеини, минерали, неструктурни сахариди и, у зависности од типа биомасе, мање количине воскова, смола, терпена, пигмената, алкалоида и пепела [9]. На слици 2.2. приказана је хемијска структура лигноцелулозне биомасе.

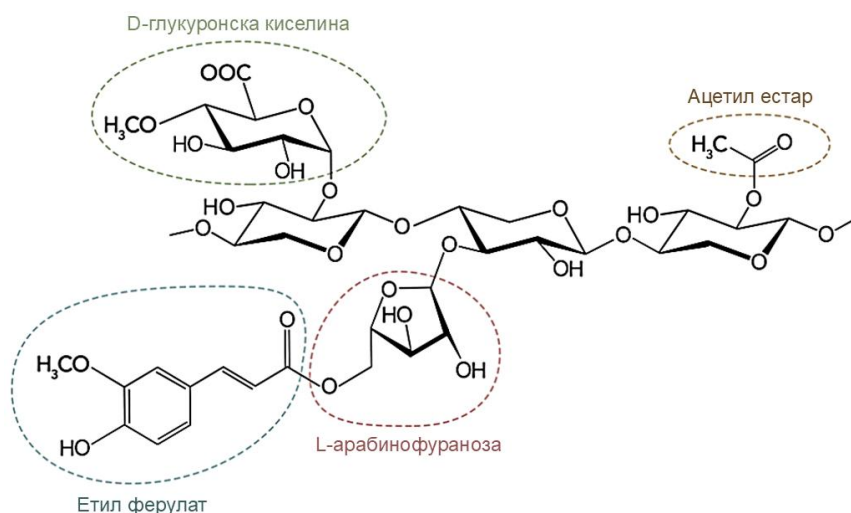


Слика 2.2. Хемијска структура лигноцелулозне биомасе

Целулоза је најраспрострањенији органски полимер на Земљи, присутан у ћелијском зиду виших биљака, неких алги и оомицета. Она представља линеарни хомополисахарид изграђен од неколико хиљада (10 000 до 15 000) мономера D-глюкозе, међусобно повезаних  $\beta$ -(1,4)-гликозидним везама. У макромолекулу целулозе присутна су два типа структурне организације, кристални и аморфни. Линеарни ланци мономера глукозе се умрежавају у кристалну решетку целулозе помоћу јаких водоничних и Ван дер Валсових веза. Стварањем интер- и интрамолекулских водоничних веза, кристална структура постаје уређенија. Ове везе настају између хидроксил групе присутне на C3 атому једног молекула глукозе и кисеоника у гликозидном прстену другог молекула. На овај начин повећава се густина кристалне структуре, која износи око  $1,6 \text{ g cm}^{-3}$  [9]. У зависности од порекла целулозе, кристална решетка чини од 30 до 80% њене структуре [28,29]. Са повећањем удела кристалне структуре целулозе расте и њена отпорност на дејство различитих типова растварача и ензима. Кристална целулоза је хидрофобна и не раствара се ни у води ни у разблаженим киселинама на ниској температури. Водоничне везе које одржавају кристалну структуру се раскидају када се на њих делује повишеном температуром или концентрованим киселинама, у којима долази и до хидролизе [29]. Са друге стране, аморфни делови целулозе лакше подлежу дејству ензима и киселина и први се разграђују. Аморфни делови целулозе су осетљивији на примену третмана због своје структуре, коју одликује неправилна диспозиција полимерних ланаца у макромолекулу. Због тога су аморфни делови мање густи од кристалне целулозе (око  $1,5 \text{ g cm}^{-3}$ ) [9]. Производи који настају разградњом целулозе зависе од степена хидролизе. У случају потпуне хидролизе настаје моносахарид D-глюкоза, а уколико је хидролиза била делимична настаје дисахарид целобиоза, уз мање фракције олигосахарида. Глукоза се може користити као извор угљеника у ферментационим процесима, резултујући производњом органских киселина и алкохола [30]. Као извори угљеника у овим процесима могу се користити и други моносахариди, попут ксилозе добијене из хемицелулозе.

Хемицелулоза представља други градивни полисахарид ћелијског зида. Организована је као разгранати хетерополисахарид, изграђен од око 200 мономерних јединица, повезан са целулозним влакнима [31]. Њен састав зависи од порекла и типа, а укључује пентозе ксилозу и арабинозу и хексозе глукозу, галактозу, манозу и рамнозу [32]. Просечна молекулска маса износи до 30 000 kDa, а структурне групе присутне у макромолекулу хемицелулозе су ксилани, манани, галактани и арабиногалактани [9]. Ксилани чине осовину хемицелулозног

макромолекула. Сачињени су од полимерног ланца D-ксилозе, уз мање количине L-арабинозе [33]. Мономери D-ксилозе су повезани  $\beta$ -1,4-гликозидним везама са суседним гранама хемицелулозе, али и међусобно. Гране хемицелулозе сачињене од L-арабинофуранозних јединица су везане за D-ксилозу у O-3 положају, док су за D-глукуронску киселину везане у O-2 положају (слика 2.3.). Састав и удео ксилана у структури хемицелулозе зависи од порекла биљке. Осим ксилана, доминантну компоненту хемицелулозе чине и манани и деривати манана (глукоманани, галактоманани, глукуронска киселина, итд.). Манани се састоје из остатака манозе повезаних  $\beta$ -1,4-гликозидним везама, док у састав галактоманана улазе јединице галактозе повезане  $\beta$ -1,6-гликозидним везама [34]. Глукуронска киселина је најзаступљенија киселина у ћелијском зиду, а у структури хемицелулозе је везана за манозу  $\beta$ -1,4 везама и за друге молекуле глукуронске киселине  $\beta$ -1,2 везама [28]. Разграната структура хемицелулозе је аморфног типа, што је чини осетљивијом на дејство спољних агенаса. Иако је нерастворна у води на ниским температурама, потребно је уложити значајно мање енергије како би се променила структура хемицелулозе, у односу на целулозу. Стога се хемицелулоза прва разграђује применом различитих третмана. Њеном разградњом настају моносахариди са пет, односно шест C атома, погодни као извор угљеника у ферментационим процесима. Осим тога, ови моносахариди се могу превести у фурфурал и 5-хидроксиметил фурфурал. Како хемицелулоза представља везу између целулозе и лигнина, њеном разградњом се олакшава и даља делигнификација биомасе.



Слика 2.3. Структурна формула ксилана и деривата (преузето и прилагођено према [9])

Лигнин је најраспрострањенији природни ароматични полимер на Земљи. Састоји се из смеше различитих ароматичних и алифатичних мономера, међусобно повезаних у структурно најкомплекснији природни полимер. У састав лигнина улазе три основна монолигнола – *p*-кумарил алкохол, кониферил алкохол и синапил алкохол (слика 2.4.). Сваки од ових алкохола представља одговарајућу градивну јединицу. H-јединица је градивна јединица *p*-кумарил алкохола, G-јединица одговара кониферил алкохолу, док је S-јединица градивна јединица синапил алкохола. Њихов међусобни однос и удео у лигнину зависе од врсте биљке, док број мономерних јединица присутних у лигнину износи приближно 4 000 [31]. У зависности од удела монолигнола разликују се три типа лигноцелулозне биомасе, односно три типа лигнина – лигнин тврдог дрвета, лигнин меког дрвета и лигнин трава. Лигнин тврдог дрвета је изграђен од кониферил алкохола (од 25% до 50%) и синапил алкохола (од 45% до 75%), лигнин меког дрвета је доминантно изграђен од кониферил алкохола (>95%), док су у лигнину трава заступљена сва три алкохола, и то *p*-кумарил алкохол са 5% до 35%, кониферил алкохол са 33% до 80% и синапил алкохол са 20% до 55% [35].



Раскидањем С-О веза и С-С веза долази до деполимеризације лигнина. Као производи деполимеризације настају различита ароматична једињења, попут фенола, гвајакола и ванилина [39]. Ова једињења представљају високо вредне производе који се још увек доминантно производе у петрохемијским рафинеријама. Прелазак на биорафинеријско добијање вредних ароматичних једињења би значајно допринео одрживости процеса њихове производње и добијању производа већег квалитета. Међутим, да би овај прелазак био могућ, неопходно је најпре раздвојити лигнин од целулозе и хемицелулозе, уз максимално очување његове природне структуре.

Целулоза, хемицелулоза и лигнин су међусобно повезани различитим типовима веза. Јаке водоничне везе су заступљене кроз читаву структуру лигноцелулозе и настају између свих компонената. Осим водоничних веза, између хемицелулозе и лигнина јављају се и етарске и естарске везе, док су лигнин и целулоза повезани етарским везама [40]. Удео ових компоненти у биомаси зависи од врсте и дела биљке, као и од њене старости. Просечни садржај целулозе, хемицелулозе и лигнина у различитим типовима лигноцелулозне биомасе приказан је у табели 2.1.

Табела 2.1. Просечни садржај целулозе, хемицелулозе и лигнина у различитим типовима биомасе [41,42].

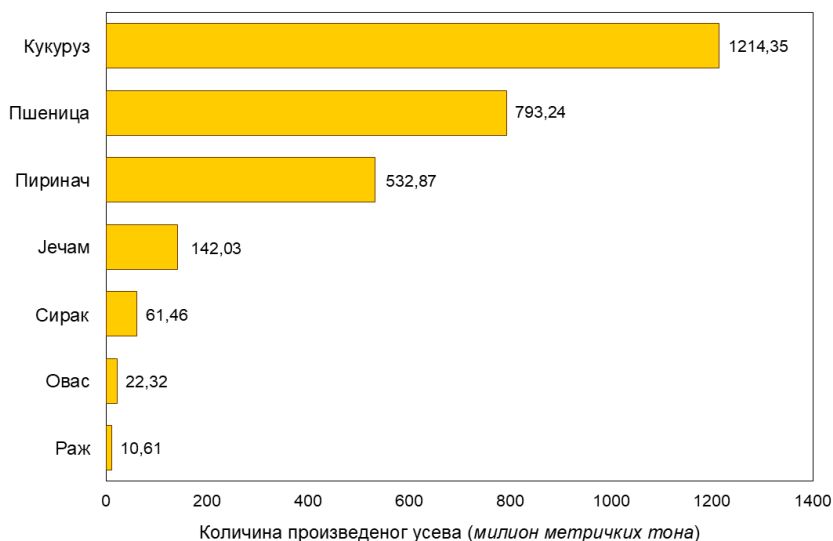
Биомаса	Садржај компоненте (%)		
	Целулоза	Хемицелулоза	Лигнин
Кукурузна стабљика	30-40	20-30	20-30
Кукурузни окласак	41	31	12
Пшенична стабљика	33-40	20-25	15-20
Пиринчана стабљика	28-36	23-28	12-14
Пиринчана љуска	37	29	24
Јечмена стабљика	38	35	16
Сојина стабљика	34	16	22
Сојина љуска	33	17	10
Багаса шећерне трске	40-45	30-35	20-30
Багаса слатког сирка	45	27	21
Кинески шаш	52	21	18
Мухар	31	24	18
Топола	44	20	29
Бамбус	45	24	20

У овој дисертацији је као сировина у експерименталном раду коришћена кукурузна стабљика. Кукурузна стабљика је одабрана због свог уједначеног хемијског састава и подједнаке заступљености главних компоненти. Испитана су својства и могућност искоришћења све три фракције лигноцелулозне биомасе. Осим тога, при избору сировине узета је у обзир и њена распрострањеност широм света, као и количине доступне за имплементацију у биорафинеријским поступцима.

### 2.2.2. Кукуруз и кукурузна стабљика

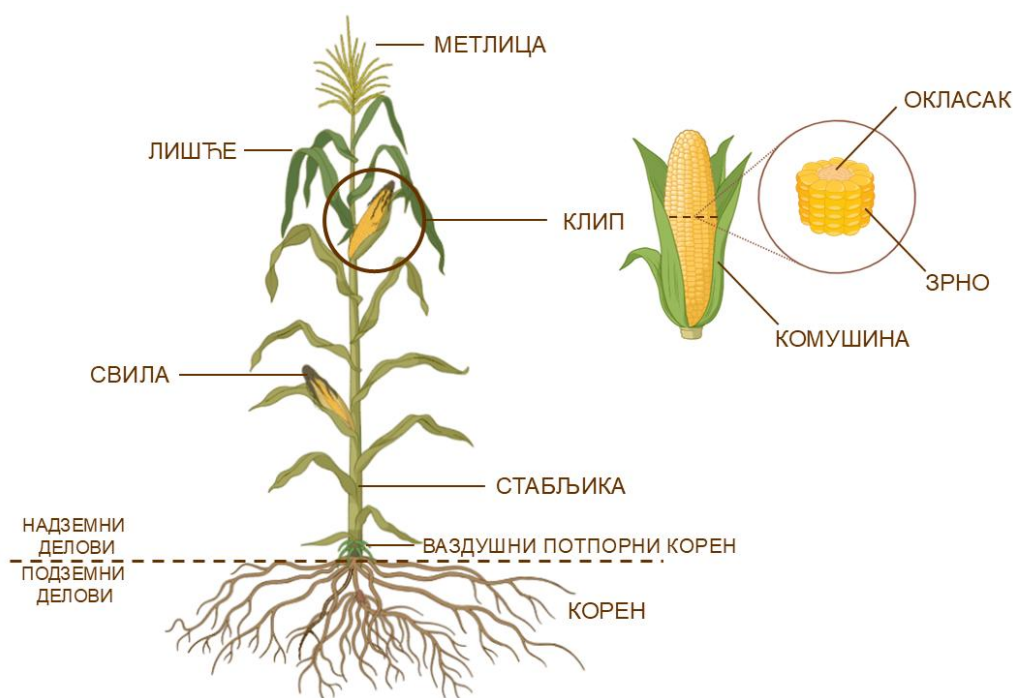
Кукуруз (лат. *Zea mays*) је једна од најважнијих и најраспрострањенијих житарица, која се употребљава у исхрани људи и животиња и као индустријска сировина. Процењује се да ће и у будућности кукуруз остати на првом месту међу житарицама по количини произведеног усева, а на основу досадашњих кретања производње, са последњим подацима у пољопривредној сезони 2024/25. од око 1 200 милиона метричких тона кукуруза (слика 2.6.) [43]. Највећи произвођачи кукуруза у свету су САД, Кина и Бразил, а за њима следи Европска Унија, док је Србија на 20. месту по обиму производње. Према Републичком заводу за статистику, у Србији је током 2024. године произведено 5 107 309 t кукуруза, који се простирао на 987 492 ha. Највећа количина овог кукуруза (око 64%) потиче са простора АП Војводине.

Просечни принос кукуруза је износио  $5,2 \text{ t ha}^{-1}$ , што је за 38,5% мање него у 2023. години [44]. Мањи принос је остварен и на нивоу Европске Уније током 2024. године, што је последица климатских услова који су били неповољни за гајење кукуруза [43].



Слика 2.6. Принос усева житарица за сезону 2024/25. на глобалном нивоу (преузето и прилагођено према [43])

Кукуруз је једногодишња биљка из породице трава (лат. *Poaceae*), чија дужина вегетације зависи од хибрида и услова спољашње средине. У зависности од врсте кукуруза, стабљика може бити висока од 0,5 m до 5 m [45]. Цилиндричног је облика и обично се састоји из двадесетак чланака (интернодуса) који раздвајају чворове (нодусе) из којих полазе листови. Листови могу бити ширине око 9 cm и дужине од 50 cm до 100 cm, а њихов број зависи од броја нодуса и интернодуса. Клипови се образују у корену листова у средишњем делу стабљике. Најчешће се образује један до два клипа по стабљики, али њихов број може варирати у зависности од подврсте и генотипа кукуруза. [46] Делови биљке кукуруза приказани су на слици 2.7.



Слика 2.7. Делови биљке кукуруза

У индустрији, кукуруз се користи у производњи хране за животиње, производа суве мељаве (кукурузна каша, кукурузно брашно, гриз и пахуљице) и производа влажне мељаве (скроб, шећер, уље, декстрин). Дестилацијом и ферментацијом кукуруза настају различити алкохоли (етил, бутил и пропил алкохол), ацеталдехиди, глицерол, као и неке органске киселине (сирћетна, млечна, јабучна и лимунска киселина) [47,48]. Осим тога, кукуруз се може користити као полазна сировина за добијање текстилних влакана, адхезива, гуме, лекова и папира [49].

Након убирања клипа и уклањања зрна – јединог јестивог дела кукуруза, кукурузна стабљика, метлица, лишће и окласак са комушином и свилом заостају као пољопривредни остаци. Иако је у већини земаља законом забрањено спаљивање жетвених остатака, ова пракса је још увек уобичајена широм света. Током 2022. године у Србији је спаљено 952 216 t биомасе заостале након бербе кукуруза, што је довело до укупне емисије  $N_2O$  и  $CH_4$  од приближно 250 kt  $CO_{2eq}$  [2]. На светском нивоу је спаљено 203 470 050 t, резултујући емисијом гасова са ефектом стаклене баште од око 19 000 kt  $CO_{2eq}$  [2]. Штетан утицај ових емисија на животну средину се може спречити давањем употребне вредности жетвеним остацима.

Кукурузна свила је богата биоактивним једињењима, попут флавоноида, флавона и фенолних киселина, пигментима и стероидима, попут ситостерола, стигмастерола, алкалоида и сапонина [49]. Захваљујући свом саставу, кукурузна свила има антиинфламаторно дејство, користи се као диуретик код обољења бубрега, а ефикасност је показала и у лечењу хроничних обољења, попут дијабетеса, гојазности и хипертензије [50,51]. Стога се најчешће прикупља, суши и конзумира у виду чаја. Док је код комушине и лишћа заступљено нешто више протеина и минералних материја, стабљика и окласак су доминантно лигноцелулозне сировине [48]. Самлевена кукурузна стабљика и окласак се, у комбинацији са другим хранивима, могу користити за прехрану животиња, док се сви заостали делови могу користити за огрев. Такође, делови стабљике се могу оставити на њиви након жетве и инкорпорирати у земљиште током даље обраде, у циљу амелиорације земљишта за наредну сетву [47]. Ипак, највеће количине неискоришћене биомасе заостале након бербе кукуруза се одлажу на депоније, стварајући велике количине отпада сваке године, или спаљују и тиме загађују животну средину [52]. Окласак представља око 20% укупне количине заостале биомасе кукуруза, док стабљика са близу 80% представља доминантну компоненту ових остатака [47]. На сваких килограм произведеног зрна кукуруза заостаје просечно око један килограм кукурузне стабљике, што на годишњем нивоу представља око милијарду тона заостале стабљике глобално [53]. Осим тога што чини највећи део жетвених остатака кукуруза, кукурузна стабљика уједно представља и најзаступљенији извор биомасе међу свим житарицама, попут пшенице, пиринча, јечма, овса, ражи (слика 2.6.) [54]. Стога је неопходно пронаћи нове начине за искоришћење ове вредне сировине у складу са циљевима одрживог развоја.

Кукурузна стабљика се састоји из три главне компоненте – целулозе (од 30% до 40%), хемицелулозе (од 20% до 30%) и лигнина (од 20 % до 30%), а њихов удео варира у зависности од хибрида, старости биљке и дела стабљике (ближе корену, односно ближе метлици) [55]. Дебљина ћелијског зида кукурузне стабљике износи око 6,8  $\mu m$ , дужина влакана око 1,32 mm, ширина влакана око 24,3  $\mu m$ , а ширина лумена око 24,3  $\mu m$  [56]. На попречном пресеку кукурузне стабљике могу се уочити два морфолошки важна региона – паренхим и спроводни снопићи (слика 2.8.). Паренхим даје облик стабљичи и има способност сакупљања и чувања хранљивих материја и воде. Зид паренхимских ћелија сачињен је претежно од целулозе и хемицелулозе. Спроводни снопићи су распоређени по читавој површини кукурузне стабљике, између ћелија паренхима. Сачињени су од ксилема и флоема, при чему је ксилем окренут ка центру, а флоем ка периферији стабљике. Основна улога спроводних снопића је транспорт воде и нутријената од корена до листова (ксилем), односно производа фотосинтезе од листова до корена и остатка биљке (флоем). Ћелијски зид ксилема је изграђен претежно од лигнина, док је у зиду флоема присутна целулоза. [57,58]



Слика 2.8. Попречни пресек кукурузне стабљике, снимљен помоћу светлосног микроскопа, увећан 20 пута

Захваљујући свом саставу који укључује висок садржај угљених хидрата, кукурузна стабљика се може користити за производњу биогорива, хемикалија и градивних јединица из којих се производе хемикалије [47]. Међутим, како би се кукурузна стабљика ефикасно превела у жељени производ, неопходно је најпре разградити њену комплексну лигноцелулозну структуру применом одговарајућег третмана.

### 2.3. Третмани лигноцелулозне биомасе

Третман лигноцелулозне биомасе представља кључни корак у њеној валоризацији. Применом третмана долази до разградње комплексне структуре лигноцелулозе до њених основних фракција – целулозе, хемицелулозе и лигнина. У зависности од приступа, третмани могу бити развијени тако да се њима уклони лигнин и део хемицелулозе, уз очување целулозе у заосталој биомаси (енгл. „*cellulose-first approach*“), или да се примарно уклони угљенохидратна компонента, при чему заостаје лигнинска фракција (енгл. „*lignin-first approach*“). У оба случаја, циљ третмана је добијање што чистијих фракција очуване структуре, како би се валоризацијом добили високи приноси производа доброг квалитета. Да би се овај циљ постигао, неопходно је да примењени третман задовољи следеће критеријуме [41,59,60]:

- (1) ефикасно уклањање лигнина, уз минимално нарушавање његове природне структуре;
- (2) смањење индекса кристаличности целулозе;
- (3) смањење величине честица и повећање порозности третиране биомасе, како би се обезбедила већа специфична површина супстрата и тиме олакшала ензимска хидролиза;
- (4) спречавање стварања инхибиторних једињења која смањују ефикасност ензимске хидролизе и ферментације;
- (5) спречавање губитака шећера нежељеном разградњом целулозе и хемицелулозе;
- (6) ефикасна примена на различитим типовима лигноцелулозних сировина;
- (7) једноставно извођење и увећање размера процеса;
- (8) утрошак мале количине енергије, уз могућност рекулације енергије;
- (9) употреба еколошки прихватљивих реагенаса;
- (10) економска исплативост процеса.

Током претходних деценија развијени су бројни третмани биомасе који се примењују на индустријском нивоу. Међутим, конвенционални третмани често не испуњавају све поменуте критеријуме. Стога се у последњих неколико година активно ради на проналажењу нових, неконвенционалних третмана, који су у складу са наведеним критеријумима, превасходно са онима који се тичу одрживог развоја. Класификација третмана лигноцелулозне биомасе приказана је на слици 2.9.



Слика 2.9. Класификација третмана лигноцелулозне биомасе

Неконвенционални третмани биомасе неретко представљају комбинацију два или више конвенционалних третмана, како би се истовремено искористиле предности ових третмана, али и превазишли недостаци њихове самосталне употребе. Наиме, многи конвенционални третмани захтевају утрошак велике количине енергије или употребу различитих реагенаса. Да би третмани засновани на употреби реагенаса били еколошки прихватљиви, неопходно је да се по завршетку третмана употребљени реагенси рекупериршу, по потреби пречисте и уврсте у нови циклус третмана или одложе на адекватан начин. Ово захтева додатно улагање енергије и финансијских средстава. Како третман биомасе често представља више од 40% укупних трошкова прераде лигноцелулозне биомасе, потребно је пажљиво проценити и одабрати адекватне услове при којима ће се третман одвијати [61]. Предности и недостаци конвенционалних третмана лигноцелулозне биомасе су приказани у табели 2.2.

### 2.3.1. Физички третмани

Основна улога физичких третмана је смањење величине честица, деполимеризација целулозе, смањење индекса кристаличности и повећање специфичне површине целулозе. Стога се третмани из ове групе примењују као први корак у процесирању лигноцелулозне биомасе, како би се олакшала њена даља разградња. Током физичких третмана не долази до стварања једињења која делују инхибиторно на микроорганизме током ферментације. Карактерише их једноставно извођење и кратка дужина трајања третмана. Иако су еколошки прихватљиви, ови третмани често захтевају велики утрошак енергије. У физичке третмане се убрајају механички третман, третман применом микроталаса, третман применом ултразвука, екструзија, пиролиза, радијација, третман применом пулног електричног поља, а у новије време се примењује и третман замрзавањем.

Табела 2.2. Предности и недостаци конвенционалних третмана [40,41,62–64]

Врста третмана		Предности	Недостаци
Физички третман	Механички третман	Не долази до стварања инхибитора; једноставно извођење; повећање специфичне површине целулозе	Енергетски захтеван третман; висока цена; не долази до уклањања лигнина
	Микроталаси	Кратка дужина трајања третмана; једноставно извођење; не долази до стварања инхибитора	Ограничена могућност скалирања процеса; висока цена
	Ултразвук	Не долази до стварања инхибитора; мали утрошак енергије; једноставно извођење	Продужавањем третмана може доћи до смањења ефикасности; ограничена могућност скалирања процеса; висока цена
	Екструзија	Једноставно извођење и на индустријском нивоу; еколошки прихватљив третман; континуалан процес	Енергетски захтеван третман; недовољна ефикасност на биомаси са већим садржајем лигнина; не може се користити самостално
	Пиролиза	Кратка дужина трајања третмана; ефикасна разградња целулозе	Енергетски захтеван третман; висока температура
	Радијација	Смањење степена полимеризације целулозе; кратка дужина трајања третмана	Висока цена; енергетски захтеван третман; неспецифичан процес
	Пулсно електрично поље	Повећање специфичне површине целулозе; кратка дужина трајања третмана; мали утрошак енергије	Недовољно развијена техника за делигнификацију; углавном се користи за екстракцију; ограничена могућност скалирања процеса
Хемијски третман	Киселине	Кратка дужина трајања третмана; могућност хидролизе до редукујућих шећера без употребе ензима	Корозија; висока токсичност; висока цена; настанак инхибиторних једињења; неопходна неутрализација
	Базе	Настаје мала количина инхибитора; ефикасно уклањање лигнина	Енергетски захтеван третман; дужина трајања третмана; потребне велике количине реагенса; неопходна неутрализација
	Соли	Еколошки прихватљив третман; висока реактивност; не долази до корозије	Настанак инхибиторних једињења; потребна велика количина соли за постизање веће ефикасности
	Органски растварачи	Кратка дужина трајања третмана; ефикасно уклањање лигнина	Потребне велике количине реагенса; енергетски захтеван третман; настанак испарљивих материја
	Јонске течности	Велики температурни опсег; добра хемијска стабилност; могућност рекулпације	Енергетски захтеван третман; висока цена; токсичност
	Дубоке еутектичке смеше	Ниска цена; биодјеградабилност; биокомпатибилност; могућност рекулпације; ниска токсичност; ефикасно уклањање лигнина	Велики вискозитет; ограничена могућност скалирања процеса

Табела 2. Предности и недостаци конвенционалних третмана (наставак)

Врста третмана		Предности	Недостаци
Физичко-хемијски третман	Хидротермални третман	Еколошки прихватљив третман; једноставно извођење и на индустријском нивоу	Дужина трајања третмана; енергетски захтеван третман; може доћи до разградње шећера
	Водена пара	Ниска цена; еколошки прихватљив третман; мали утрошак енергије	Висока температура; настанак инхибиторних једињења; може доћи до разградње шећера
	Суперкритични флуиди	Низак вискозитет; добра дифузивност; ниска цена; еколошки прихватљив третман; могућност рекулпације	Енергетски захтеван третман; рад под високим притиском
	Амонијак	Настаје занемарљива количина инхибитора; повећање специфичне површине целулозе; висока селективност	Корозија; недовољна ефикасност на биомаси са већим садржајем лигнина
	Оксидативни третмани	Висока селективност; еколошки прихватљиви третмани; амбијентални реакциони услови; не долази до стварања инхибитора	Висока цена озона; може доћи до губитка шећера услед неселективне оксидације; ограничена могућност скалирања процеса
Биолошки третман	Гљиве	Благи реакциони услови; не долази до стварања инхибитора; мали утрошак енергије	Дужина трајања третмана; низак принос целулозе
	Бактерије	Мали утрошак енергије; еколошки прихватљив третман; минимална производња штетних једињења	Дужина инкубације; ниска ефикасност уколико се примењује самостално
	Ензими	Висока селективност; мали утрошак енергије; нема употребе реагенса	Висока цена; потребна велика количина ензима; ограничена могућност скалирања процеса

*Механички третман* подразумева све методе којима се смањује величина честица, али и кристалинност и степен полимеризације целулозе [41]. Овај третман обухвата сецкање, дробљење и различите врсте млевења, попут мокрог и сувог млевења, млевења куглама, дисковима, вибрационом енергијом, колоидно млевење, итд. Уложена енергија за уситњавање често износи и трећину укупне енергије потребне за третман биомасе, чиме се значајно увећавају оперативни трошкови третмана [65]. Пораст оперативних трошкова се може контролисати ограничавањем млевења биомасе до величине честица од 1 mm до 3 mm, колико је довољно за ефикасну хидролизу [40]. Иако енергетски захтеван, механички третман је неизоставан корак који претходи осталим третманима, чак и када се за разградњу биомасе примењују други физички третмани.

*Третман микроталасима* се заснива на примени микроталасног зрачења фреквенције од 0,3 GHz до 300 GHz, које доводи до кидања водоничних веза и слабљења међумолекулских веза присутних у биомаси [66]. За разлику од конвенционалног загревања, применом микроталаса се пренос топлоте не врши само са површине, већ по читавој запремини узорка у врло кратком времену. Током микроталасног зрачења, у узорку настају зоне са знатно вишом температуром, тзв. „вруће тачке“ (енгл. *hotspots*), које осим повишене температуре карактерише и нешто виши притисак. У овим зонама долази до дехидратације угљено-хидратне компоненте. Дужим излагањем угљено-хидратне компоненте овим зонама могу настати фурфурал и 5-хидроксиметилфурфурал, који имају инхибиторни ефекат на ензиме и микроорганизме који се користе за ферментацију. Ово се може спречити комбиновањем микроталаса са хемијским третманима, тј. употребом различитих растварача, попут киселина, база и дубоких еутектичких смеша и модификацијом параметара и времена третмана. Додавањем реагенса у систем се може скратити трајање третмана, док се истовремено олакшава разградња лигноцелулозе. Осим термалног, примена микроталаса има и нетермални ефекат на деградацију биомасе. Током зрачења долази до диелектричне поларизације влакана, при чему се кидају водоничне везе, услед осцилаторног кретања дипола и судара међу молекулима [67]. Овај ефекат утиче пре свега на структуру целулозе, док повишена температура и притисак доводе до разградње хемицелулозе и лигнина [25].

*Третман ултразвуком* користи принцип кавитације за разградњу лигноцелулозне биомасе. Применом ултразвучног зрачења фреквенције од 10 kHz до 100 kHz долази до формирања кавитационих зона у течној фази [68]. Ове зоне имају изглед налик на мехурове који расту до критичне величине, након чега пуцају. Пуцањем кавитационих зона локално се повећавају притисак (до 1 800 atm) и температура (у опсегу од 2 000 K до 5 000 K), изазивајући снажне микроударе и смицајне силе којима се разбија густа мрежа влакана и нарушава структура лигноцелулозе. Током третмана ултразвуком долази и до раскидања  $\alpha$ -O-4 и  $\beta$ -O-4 веза присутних у лигнину [69]. На овај начин се лигнин одваја од угљено-хидратне компоненте, чинећи целулозу доступнијом целулазама и повећавајући ефикасност ензимске хидролизе. Међутим, дуготрајна примена ултразвука, као и примена високих фреквенција могу изазвати међусобне сударе честица и њихову поновну агрегацију, чиме се смањује ефикасност третмана [70]. Осим тога, при високим фреквенцијама може доћи до стварања кавитационих зона непосредно око извора ултразвука, ограничавајући даљи пренос енергије по читавој запремини узорка [40]. Овај проблем се може избећи комбиновањем третмана ултразвуком са хемијским реагенсима, као и у случају третмана микроталасима.

*Екструзија* је термо-физички третман који подразумева комбинацију неколико различитих операција. Мешање и устињавање сировине се врши на високим температурама (вишим од 300 °C), док физичке промене у структури лигноцелулозе изазивају смицајне силе. Третман се одвија у екструдеру, сачињеном од једне или две Архимедове навојнице које се ротирају унутар цилиндра, потискујући биомасу уз зидове цилиндра, при чему трење изазива пластичне деформације у структури биомасе [25]. Поступак може бити сув, када у екструдер улази сува и сирова биомаса, или влажан, када се на биомасу делује воденом паром, стварајући услове сличне третману биомасе у аутоклаву. Предност овог третмана је што се може изводити континуално или полуконтинуално, а претходно уситњавање биомасе није потребно.

Ефикасност третмана зависи од процесних параметара, односно температуре на којој се третман одвија и дужине трајања третмана. Високи приноси се остварују применом високих температура у краћем временском периоду, односно нижих температура током дужег временског периода [71]. Међутим, како је раздвајање чврсте и течне фазе отежано, екструзија се ретко користи самостално, те је неопходна употреба реагенса.

*Пиролиза* такође спада у термо-физичке третмане и представља термичко разлагање биомасе у одсуству молекулског кисеоника. Током овог третмана, биомасе се излаже температурама изнад 300 °C, а органске компоненте биомасе се разлажу до био-чађи, био-уља и некондензованих гасова (CO, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, C<sub>n</sub>H<sub>m</sub> и CO<sub>2</sub>) [72]. Њихов састав и удео зависе од реакционих услова. Применом нижих температура се повећава дужина трајања третмана, али настаје мање испарљивих производа. Са друге стране, тзв. брза пиролиза подразумева загревање сировине применом вреле паре у временском интервалу краћем од једне секунде. Током овог процеса долази до ликвефакције или утечњавања биомасе, која се преводи у био-уље са приносом од око 75% [73]. Као ни у случају екструзије, ни пиролиза не захтева претходно уситњавање биомасе, а настали гасовити производи се могу користити као извор енергије у самом процесу, чинећи овај третман само-одрживим. Ефикасност се може додатно повећати применом катализатора попут метала, оксида метала и зеолита [25].

*Радијација* биомасе се може вршити применом гама зрака и електронског снопа. Гама зраци имају способност продирања дубоко у лигноцелулозну биомасу, изазивајући структурне промене лигнина на нивоу атома [74]. Ове промене су изазване слободним радикалима који настају током третмана. Слободни радикали имају способност раскидања гликозидних веза, што доводи до разградње полисахарида и смањења кристаличности целулозе [75]. Третман биомасе гама зрацима би требало изводити у посебним коморама, како би се осигурала безбедност процеса. Механизам разградње биомасе применом електронског снопа се такође заснива на стварању слободних радикала који слабе и кидају водоничне везе у молекулу целулозе [25]. Третман биомасе применом електронског снопа делује превасходно на целулозу. Да би се постигла делигнификације и делимично разградила хемицелулоза, овај третман би требало комбиновати са хемијским или физичко-хемијским третманима [76]. Разградња биомасе радијацијом је чист процес током којег не настају инхибиторна једињења и за његово извођење није неопходна употреба реагенса. Међутим, због високе цене процеса, велике количине енергије коју треба уложити и безбедносних мера које треба предузети, овај третман биомасе је најмање заступљен.

Третман применом *пулсног електричног поља* се заснива на електропермеабилности ћелијске мембране када услед примене спољног електричног поља дође до превазилажења трансмембранског потенцијала. Када се на ћелију делује пулсним електричним пољем, у зависности од услова, долази до пораста пермеабилности ћелијске мембране, а често се користи и термин електропорација [68]. Мембрански потенцијал се повећава, док селективност мембране опада, а пермеабилност мембране расте. У зависности од јачине примењеног поља, која се најчешће креће у опсегу од 0,1 kV cm<sup>-1</sup> до 80 kV cm<sup>-1</sup>, изазване промене могу бити привремене или трајне [25]. Нарушавањем структуре ћелијске мембране, целулоза постаје изложена дејству других агенаса, укључујући и хидролитичке ензиме. Осим тога, применом овог третмана могу се уклонити и значајне количине лигнина [77]. Међутим, овај начин третирања биомасе је још увек недовољно истражен, те ни механизми по којима долази до разградње лигноцелулозе нису познати.

*Замрзавање* представља новији начин третирања биомасе, заснован на промени запремине воде током њеног преласка из течног у чврсто стање. Третман замрзавањем подразумева мешање биомасе са малом количином воде и њено замрзавање. Вода најпре дифундује у биомасу, а након излагања ниској температури прелази у чврсто агрегатно стање. Запремина воде којом је биомаса натопљена се повећава током стварања леда, што доводи до нарушавања структуре ћелијског зида [78]. Овај процес је еколошки прихватљив јер нема употребе реагенса, ни настанка инхибиторних једињења. Осим конвенционалног начина замрзавања, за значајно смањење дужине третмана се може користити и течни азот [79].

Такође, није неопходно претходно уситњавање биомасе. Третирана биомаса постаје крхка и лако се разбија на ситније делове, те се замрзавањем биомасе пре механичког третмана могу значајно смањити потребе за енергијом уложеном у млевење [79]. Третман биомасе замрзавањем је заступљенији у земљама које карактерише хладнија клима, попут нордијских земаља. У овим земљама се на почетку хладног периода биомаса натапа водом, а затим износи на поља и оставља на њима да се замрзне на ниским температурама [78].

### 2.3.2. Хемијски третмани

Хемијски третмани биомасе се заснивају на примени неорганских и органских реагенса, попут киселина, база и различитих врста органских растварача. Ефикасност ових третмана зависи од карактеристика самог реагенса, као и од процесних услова. У хемијске третмане се убрајају третман киселинама или чешће коришћен израз - кисели третман, третман базама – алкални третман, третман солима, третман органским растварачима, јонским течностима и третман дубоким еутектичким смешама. Према неким класификацијама, у хемијске третмане се убрајају и третмани из групе оксидативних процеса. Међутим, због начина њиховог извођења и механизма по којима долази до разградње биомасе, оксидативни третмани у овој дисертацији су сврстани у физичко-хемијске третмане.

*Кисели третман* се врши применом концентрованих или разблажених киселина. Од концентрованих киселина најчешће се користе сумпорна, хлороводонична, азотна и сирћетна киселина. Ове киселине имају јак хидролитички потенцијал према целулози, која се током третмана разлаже до редукујућих шећера. Током хидролизе концентрованим киселинама долази и до стварања инхибиторних једињења, а саме киселине су корозивне, те је неопходно изводити третман у реакторима који су отпорни на корозију. Осим тога, употребљене киселине би након третмана требало рекуперисати и пречистити, што захтева додатно улагање енергије. Стога се за кисели третман чешће бирају разблажене киселине, којима се такође може постићи разградња полисахарида до редукујућих шећера. Међу разблаженим киселинама које се користе, 4% раствор сумпорне киселине се показао као најефикаснији у хидролизи угљено-хидратне компоненте [40]. Међутим, када се за хидролизу користе разблажене киселине, неопходно је применити високе температуре, у опсегу од 120 °C до 200 °C, како би се обезбедила жељена ефикасност третмана [25]. Висока ефикасност се може постићи и променом извора топлоте, односно употребом ултразвука или микроталаса за загревање узорка. Кисели третман доводи до разградње угљено-хидратне компоненте лигноцелулозе, док се структура лигнина само делимично модификује у форму агрегираних лигнина који се не могу искористити адекватно и најчешће се само спаљују.

*Алкални третман* се користи за постизање високог степена делигнификације третиране биомасе. За извођење третмана се користе различите базе – натријум-хидроксид, калијум-хидроксид, калцијум-хидроксид, амонијум-хидроксид и натријум-карбонат, при чему се највећа ефикасност постиже применом натријум-хидроксида [80]. Применом алкалних раствора долази до кидања естарских, арил етарских и С-С веза у реакцији сапонификације [41]. На овај начин се лигнин одваја од угљено-хидратне компоненте, те целулоза и хемицелулоза постају доступније ензимима. Хемицелулоза се делимично раствара услед уклањања ацетил и уронских функционалних група [34]. Током алкалног третмана долази и до бубрења целулозе, повећања њене специфичне површине и смањења степена полимеризације и кристаличности. Повећање порозности целулозне фракције додатно олакшава пролазак ензима, те се применом алкалног третмана истовремено остварује висок степен делигнификације уз високе приносе редукујућих шећера. Када се изводи на собној температури, овај третман траје и до неколико дана. Дужина трајања третмана се може смањити на неколико часова применом високих температура [81]. Додатно повећање ефикасности третмана се може постићи применом алтернативних извора загревања, попут микроталаса или ултразвука.

*Третман солима* подразумева додавање соли у смешу биомасе и воде, при чему у воденој средини настају метални комплекси и Луисове киселине. Додавањем металних соли у

воду настају јаке ковалентне везе између метала и молекула воде, стварајући тзв. „хидратационе сфере“. Ове сфере се састоје од јона метала у центру за који је везано шест молекула воде [82]. Ове сфере реагују пре свега са гликозидним везама присутним у хемицелулози, при чему се она одваја од лигнина и целулозе, али уз очување структуре ксилана [25]. Осим хемицелулозе, применом металних соли долази и до разградње аморфних делова целулозе, као и до делимичног уклањања лигнина. Међутим, да би се постигла ефикаснија делигнификација, неопходно је применити веће количине соли. Такође, током овог третмана могу настати и инхибиторна једињења.

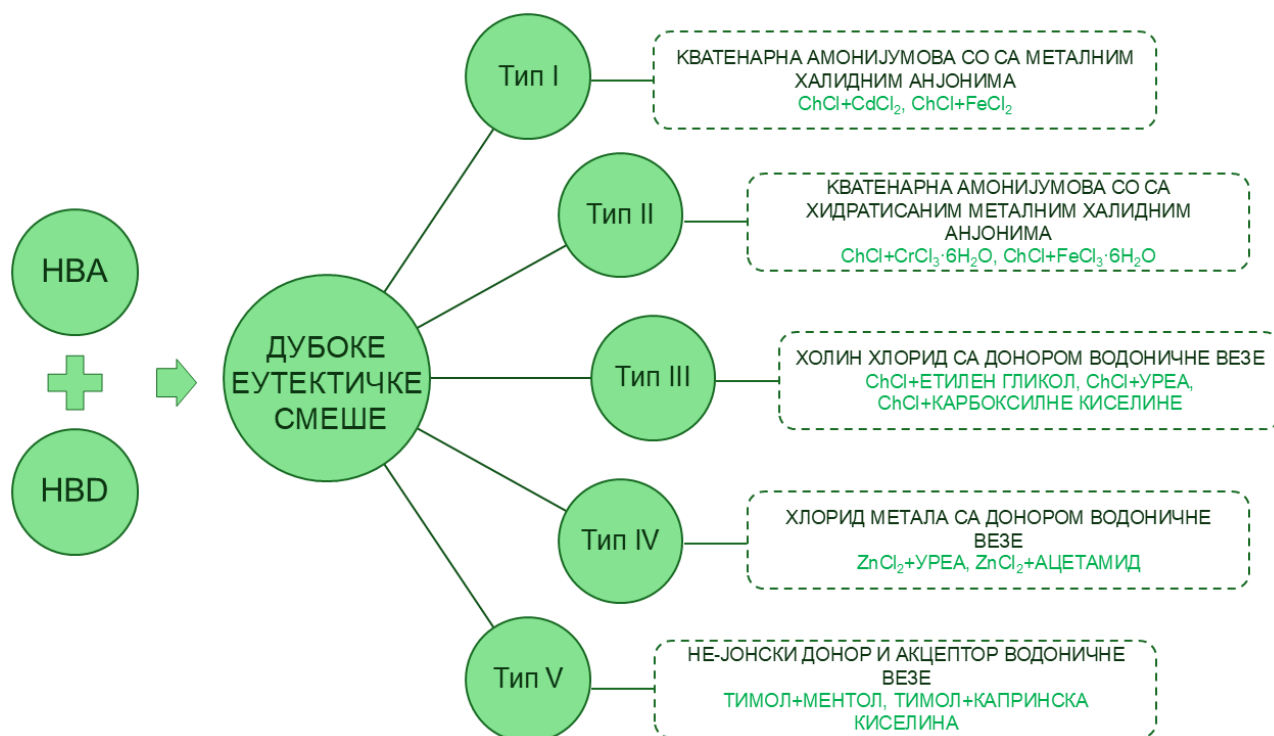
Третман органским растварачима заснива се на употреби органских растварача, њихових водених раствора или њихових смеша. За третман биомасе се користи велики број органских растварача различитих својстава, попут етанола, метанола, ацетона, перокси киселина, етилен и триетилен гликола [40]. Примењеним третманом се раскидају  $\alpha$ -О-арил,  $\beta$ -О-арил и 4-О-метилглукуронске естарске везе у молекулима лигнина и хемицелулозе, што олакшава њихово растварање [25]. На овај начин се повећава специфична површина целулозе, порозност, као и њена доступност ензимима. Растварачи се након третмана могу једноставно рекуперисати и поново користити, повећавајући одрживост процеса. Третман се изводи од 30 min до 90 min, у температурном опсегу од 120 °C до 200 °C, при pH између 2 и 3,8 [83]. Увођењем катализатора у систем се може снизити температура извођења процеса и уједно повећати брзина делигнификације. Као катализатори се користе различите минералне киселине (хлороводонична, сумпорна и фосфорна киселина), органске киселине (салицилна, оксална, мравља и сирћетна киселина), базе (калцијум-хидроксид, натријум-хидроксид и амонијак) и, ређе, неке врсте соли (магнезијум-хлорид) [40,83]. Одабир катализатора зависи од процесних параметара, а најчешће се користи сумпорна киселина.

Јонске течности се састоје од органског катјона (имидазолијум, пиридинијум, алифатични амонијум, алкиловани фосфонијум и сулфонијум јони) и неорганског ањона [25]. Физичка и хемијска својства јонских течности зависе од састава, структуре катјона и степена делокализације наелектрисања ањона. Заједничка карактеристика свих јонских течности је тачка топљења нижа од 100 °C, као и добра термичка и хемијска стабилност [40]. Ове течности су високо реактивне, нетоксичне и ефикасне у третману биомасе. Механизам њиховог деловања на структуру биомасе заснива се на конкуренцији у стварању водоничних веза између јонске течности и компоненти лигноцелулозе, чиме се нарушавају постојеће нековалентне везе у лигноцелулози. Међутим, висока цена, ограничена растворљивост у води и слаба биоразградивост ограничавају њихову примену на индустријском нивоу, те се за третман чешће користе дубоке еутектичке смеше [84].

Дубоке еутектичке смеше (енгл. *Deep Eutectic Solvents DES*) представљају нову генерацију растварача, који имају унапређена својства у погледу одрживости у односу на јонске течности и органске раствараче. Састоје се од акцептора водоничне везе (енгл. *Hydrogen Bond Acceptor; HBA*) и донора водоничне везе (енгл. *Hydrogen Bond Donor; HBD*). Када се помешају у одговарајућем молском односу, ове компоненте имају нижу тачку топљења од тачке топљења појединачних компоненти. Овај феномен се заснива на јаким водоничним и ван дер Валсовим везама које се стварају између HBA и HBD [85,86]. Стога је припрема DES значајно олакшана у односу на јонске течности.

DES се могу представити општом формулом  $Cat^+X^-Y_z$ , при чему  $Cat^+$  означава катјон (амонијум, фосфонијум или сулфонијум јон),  $X^-$  је Луисова база (обично халидни ањон),  $Y$  је Луисова или Бренштедова киселина, док је  $z$  број  $Y$  врста које интерагују са  $X^-$  [87]. На основу састава, сврставају се у пет група (слика 2.10.): DES које се састоје из кватернарних амонијумових соли са металним халидним ањонима (тип I), односно хидратисаним металним халидним ањонима (тип II), DES на бази холин хлорида и једињења попут карбоксилних киселина, амида, или глицерола (тип III), DES на бази хлорида метала са HBD попут урее, амида или алкохола (тип IV), док се као посебна група издвајају DES у чији састав не улазе јони, већ читави молекули (тип V) [88–90]. Осим тога, постоји још неколико подела заснованих на њиховом саставу или физичко-хемијским својствима. У зависности од pH вредности, DES

могу бити киселе, неутралне или базне [88]. На основу афинитета према води деле се на хидрофилне и хидрофобне, а нарочито су значајне природне дубоке еутектичке смеше (енгл. *Natural Deep Eutectic Solvents, NADES*). У састав NADES улазе искључиво природне компоненте, попут примарних метаболита биљака (тип III, слика 2.10.). Захваљујући свом саставу, овај тип еутектичких смеша је биоразградив, биокомпатибилан, нетоксичан, еколошки прихватљив и припада групи зелених растварача [91,92]. NADES се користе у третману лигноцелулозне биомасе, најчешће као смеша холин хлорида или бетаина као НВА и карбоксилне киселине као НВД [93]. Међу карбоксилним киселинама, млечна киселина се истакла као нарочито ефикасна, захваљујући великом броју хидроксилних група присутних у смеси са холин хлоридом, уз већу мобилност протона у оваквом систему [94].



Слика 2.10. Класификација дубоких еутектичких смеша према саставу (преузето и прилагођено према [90])

Механизам разградње биомасе применом NADES заснива се на кидању водоничних и ковалентних веза у лигноцелулози, олакшавајући њено фракционисање. Применом NADES на бази холин хлорида лигнин се преводи у мономере, услед кидања великог броја  $\beta$ -O-4 веза и делимичног раскидања C-C веза ( $\beta$ - $\beta'$  и  $\beta$ -5' веза) [95]. Током третмана киселим смешама долази најпре до уклањања Са алкохола, при чему у бочном ланцу лигнина настају високо реактивни бензил радикали. На овај начин се нарушава коњугована структура лигнина кидањем Са веза, а лигнин се деполимеризује [96]. Осим тога, лигнин се може разградити и оксидацијом. Оксидовањем Са алкохола до кетона и ациловањем С $\gamma$  примарних алкохола олакшава се раскидање  $\beta$ -O-4' веза кроз различите реакције (нпр. елиминација, хидролиза) [97]. Поред наведених механизма, током третмана лигноцелулозне биомасе применом NADES може доћи и до реакција дехидратације, кондензације, деетоксилације и ациловања, које такође доводе до разградње лигноцелулозне структуре [98]. Адекватним одабиром компоненти које ће ући у састав NADES, као и њиховог међусобног односа, могу се подешавати физичко-хемијска својства смеси и прилагодити потребама третмана.

Без обзира на хемијски састав, све NADES карактерише велика вискозност, што може утицати на ефикасност примењеног третмана. Како би се овај проблем превазишао, у NADES се додаје вода, било као компонента смеси током саме припреме или непосредно пред извођење третмана. Међутим, превише воде у смеси може нарушити њену структуру и смањити ефикасност делигнификације, те њен удео не би требало да прелази 30% (мас.)

[92,99]. Вискозитет се може смањити и повишењем температуре на којој се третман изводи. Загревање може бити конвенционално, али је потребно вршити га у дужем временском периоду. Како би процес био одрживији, као извор топлоте могу се користити микроталаси или ултразвук [93,100–102]. Комбиновањем NADES са овим физичким третманима постиже се ефикаснија делигнификација. Такође, одрживости процеса значајно доприноси и могућност рекулације NADES, при чему се иста смеша може користити за третман и до пет пута [103].

### 2.3.3. Физичко-хемијски третмани

Физичко-хемијски третмани изазивају истовремено механичке и хемијске промене у лигноцелулозној биомаси и тиме поспешују њену разградњу. У физичко-хемијске третмане се убрајају хидротермални третман, експлозија воденом паром, третман суперкритичним флуидима, декомпозиција експлозијом у присуству амонијака и оксидативни третмани.

*Хидротермални третман* подразумева примену воде на повишеној температури, у опсегу од 170 °C до 230 °C, и притиску до 5 МПа [41]. При наведеним условима долази до хидролизе хемцелулозе, уз ослобађање ацетил група, као и до делимичне разградње лигнина. На овај начин целулоза постаје доступнија ензимима. Како би се спречио настанак инхибиторних једињења, хидротермални третман се изводи у контролисаном рН опсегу, од 4 до 7 [104]. Због једноставног извођења, овај третман је погодан за примену на индустријском нивоу. Међутим, употреба велике количине воде, која захтева и улагање велике количине енергије, смањује одрживост овог процеса [64].

*Експлозија воденом паром* је у основи третман сличан хидротермалном третману. Биомаса се третира засићеном воденом паром у сличном температурном опсегу (од 160 °C до 260 °C) и притиску до 5 МПа, у трајању од свега неколико минута [41]. При овим условима молекули воде лако продиру у структуру биомасе. Механизам разградње се заснива на нагомобарању притиска током којег молекули воде експлозијом напуштају биомасу, кидајући гликозидне везе унутар целулозне и хемцелулозне компоненте биомасе, али и везе између хемцелулозе и лигнина [105]. Као и применом топле воде, током овог третмана такође долази до хидролизе хемцелулозе и настанка сирћетне киселине. Настала сирћетна киселина делује као катализатор на даљу разградњу биомасе. Због тога се овај третман другачије назива и *аутохидролиза* [106]. За разлику од хидротермалног третмана, овај третман је енергетски ефикаснији, а уз то и еколошки прихватљив и не захтева употребу реагенса. Осим тога, када се користи за устињавање биомасе, неопходно је уложити 70% мање енергије за постизање исте величине честица него када се користи механички третман [107]. Међутим, примена високих температура може довести до стварања инхибиторних једињења, као и до нежељене разградње шећера који се након третмана не могу издвојити и користити.

*Суперкритични флуиди* су флуиди који истовремено поседују особине гаса и течности. Када се нађу на притисцима и температурама изнад критичних вредности, коефицијент дифузије и вискозитет ових флуида је близак гасовима, док је истовремено њихова густина блиска густини течности. Флуиди оваквих карактеристика лакше продиру у биомасу и ефикасније разграђују њену структуру [60]. За третман биомасе углавном се користи суперкритични угљеник (IV) оксид. Веома ретко се примењује и сумпор (IV) оксид, али тај третман обично претходи аутохидролизи [108]. Како и вода поседује сличне особине када се изложи високим притисцима и температурама, често се и она сврстава у суперкритичне флуиде. При високим притисцима, суперкритични угљеник (IV) оксид продира у густу мрежу лигноцелулозних влакана и делимично разграђује комплекс хемцелулоза-лигнин. Када дође у контакт са водом, угљеник (IV) оксид се раствара и настаје угљена киселина, која делује као катализатор хидролизе хемцелулозе. Осим тога, спуштањем притиска долази до физичког пуцања структуре лигноцелулозе, као и у случају аутохидролизе [41]. Ово доводи до повећања порозности и специфичне површине целулозе, као и до ефикаснијег продирања ензима до целулозе. Применом суперкритичног угљеник (IV) оксид не настају инхибиторна једињења, нема штетног утицаја на животну средину и не долази до нежељене разградње угљенохидратне компоненте. Такође, одрживости третмана доприноси и могућност рекулације

угљеник (IV) оксида и његовог поновног коришћења без губитка ефикасности. Међутим, за постизања високог притиска неопходно је уложити велику количину енергије [41].

У третмане који се изводе при високим притисцима сврстава се и *декомпозиција експлозијом у присуству амонијака* (енгл. *Ammonia Fibre Expansion, AFEX*). Овај третман се одвија по истом механизму као експлозија применом водене паре или суперкритичних флуида. Биомаса се меша са течним амонијаком, најчешће у односу 1:1, а затим се излаже високом притиску (од 1,7 МПа до 2,1 МПа) и нешто нижим температурама, у опсегу од 60 °C до 100 °C [40]. Третман траје од 5 min до 30 min, током којих се биомаса натапа раствором амонијака и бубри. Након тога, притисак се снижава, при чему молекули гаса нагло напуштају биомасу и доводе до њеног пуцања. На овај начин се смањује кристаличност целулозе, а везе између лигнина и угљено-хидратне компоненте слабе или се потпуно кидају. Истовремено долази до уклањања ацетил група из хемицелулозе и њене делимичне разградње, знатно мање него у случају аутохидролизе [25]. Током овог третмана не настају инхибиторна једињења и нема губитка шећера услед нежељене разградње угљено-хидратне компоненте. Осим тога, није неопходно додатно испирање биомасе, чиме се значајно смањују количине отпадне воде. Међутим, висока цена амонијака и његово корозивно дејство на реакторе у којима се третман изводи ограничавају његову примену.

*Оксидативни третмани* се заснивају на употреби оксидационих средстава који доводе до деполимеризације биомасе кроз кидање веза унутар лигнина, разградњу хемицелулозе и делимичну разградњу целулозе. У ову сврху користе се кисеоник, озон, водоник пероксид и перокси киселине, попут пермравље и персирћетне киселине [59]. Механизми разградње биомасе зависе од употребљеног оксидационог средства. Чист кисеоник или ваздух се користи у комбинацији са водом у процесу тзв. влажне оксидације. Биомаса се излаже води и кисеонику на повишеним температурама (од 120 °C до 240 °C) и притисцима (од 0,3 МПа до 3,3 МПа) [109]. Током овог третмана, најпре долази до разградње хемицелулозе. Ослобађањем ацетатних група хемицелулозе и у реакцијама деестерификације настају органске киселине које катализују хидролизу хемицелулозе [59]. Уколико се третман изводи на температурама до 170 °C, долази до разградње хемицелулозе и делимичне разградње лигнина, док целулозна фракција заостаје у третираној биомаси. Међутим, при температурама од 170 °C до 240 °C долази до фрагментације све три компоненте лигноцелулозе, које се потпуно разграђују до угљеник (IV) оксида, воде и карбоксилних киселина [110]. Овакав механизам доводи до минималног настанка инхибиторних једињења током третмана. Озон је најефикасније оксидационо средство, са редокс потенцијалом од +2,076 V [111], веома реактивно, нарочито према лигнину. Како је у дефициту електрона, озон лако интерагује са лигнином, полимером богатим електронима. У овој интеракцији настају карбоксилне киселине, попут мравље и сирћетне, које катализују даљу разградњу лигноцелулозе [40]. Релативно мала концентрација и број инхибиторних једињења настаје током озонизације [110].

Водоник пероксид је такође оксидационо средство које је високо реактивно према лигнину. Током третмана водоник пероксидом долази пре свега до разградње хемицелулозе и лигнина, чиме се повећава доступност целулозе ензимима. Механизам разградње се заснива на раскидању алкил/арил етарских веза, оксидативној разградњи ароматичног језгра, као и електрофилној супституцији бочних ланаца [112]. Механизам разградње биомасе применом водоник пероксида детаљно ће бити описан у одељку 2.3.5. Међу перокси киселинама најзаступљенија је персирћетна киселина, захваљујући својој стабилности [113]. Ова киселина је високо селективна према лигнину. Она оксидује хидроксил групе до карбонилних група у бочним ланцима лигнина и истовремено кида  $\beta$ -арил етарске везе лигнина. Као резултат ових промена настаје лигнин мање молекулске масе, чија је растворљивост у води већа у односу на природни лигнин [59]. Као и у случају других оксидативних третмана, применом персирћетне киселине се уклања лигнин и повећава се доступност целулозе ензимима.

### 2.3.4. Биолошки третмани

Биолошки третмани подразумева опонашање поступка разградње лигноцелулозе која се дешава у природи, али у контролисаним условима. Третман се заснива на примени микроорганизама који имају способност да произведу ензиме и/или друге хемијске супстанце (етанол, глицерол, карбоксилне киселине) којима се може нарушити структура лигноцелулозе. За овај третман могу се користити цели организми – гљиве и бактерије, или се он може вршити директно, применом екстраката или чистих ензима.

За третман гљивама користе се гљиве изазивачи белог и браон труљења из групе базидиомицета и гљиве изазивачи меког труљења из групе аскомицета и деутеромицета. Најзаступљеније су гљиве изазивачи белог труљења, попут *Phanerochaete chrysosporium*, *Cerioporia lacerata*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Cyathus stercoleris* и *Ceriporiopsis subvermispota* [112]. Гљиве изазивачи белог труљења производе ензиме из групе лаказа и пероксидаза, које имају способност разградње лигнина. Гљиве изазивачи браон труљења врше деполимеризацију целулозе и само делимично мењају структуру лигнина. Фактори који утичу на третман гљивама су садржај влаге, величина честица, температура инкубације, рН вредност и нутритивни састав медијума, односно садржај угљеника, азота и фосфора [114]. Иако овај третман не захтева примену реагенса, еколошки је прихватљив и селективан према лигнину, уз минимални утрошак енергије, његов главни недостатак је дужина трајања. Осим тога, гљиве у свом метаболизму троше угљеник присутан у биомаси, чиме се смањују приноси производа насталих у ферментативним процесима [115].

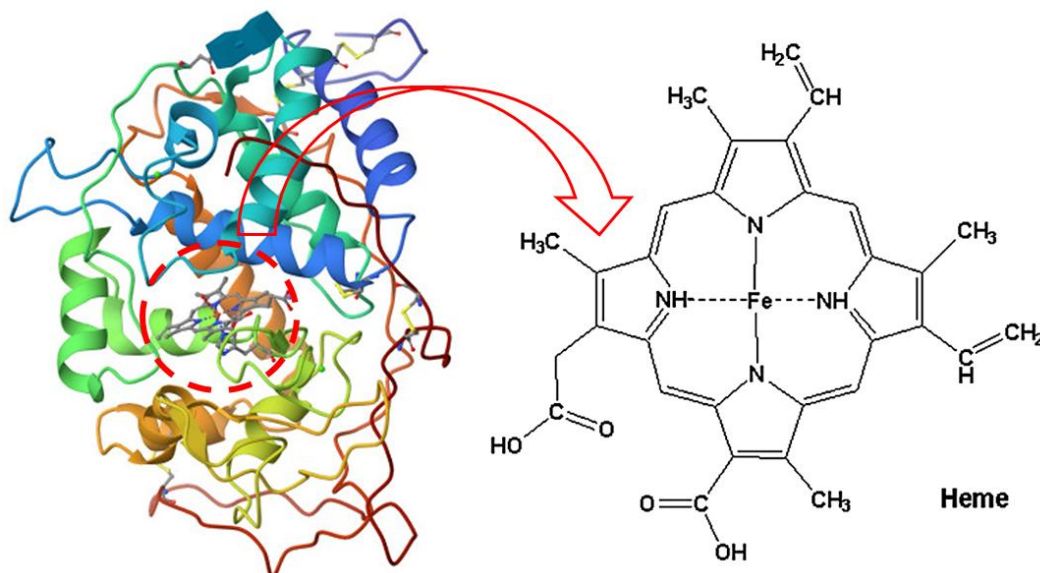
Лигноцелулозна биомаса се може третирати и појединим бактеријама из родова *Clostridium sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Thermomonospora sp.* и *Streptomyces sp.*, које производе екстрацелуларне лигнинолитичке ензиме [116]. Разградња лигноцелулозе применом бактерија траје краће у поређењу са третманом гљивама. Међутим, бактерије показују и мању ефикасност у делигнификацији биомасе, те се оне најчешће користе у комбинованим третманима биомасе. Њихова ефикасност може се повећати применом специфично адаптираних или генетички модификованих бактерија [117].

Механизам разградње лигноцелулозе гљивама и бактеријама заснива се на њиховој способности да произведу системе ензима. Ови системи се састоје из две групе екстрацелуларних ензима – хидролитичких, који имају способност да разграде полисахариде, и лигнинолитичких, који разграђују лигнин и ароматични прстен [118]. Како би се превазишао главни недостатак третмана гљивама и бактеријама, дужина трајања третмана се може значајно смањити применом чистих ензима или одговарајућих ензимских коктела. За превођење целулозе у глукозу користи се смеша ензима из групе целулаза – ендоглуканазе, целобихидролазе и  $\beta$ -глукозидазе. Ендоглуканазе хидролизују  $\beta$ -1,4-гликозидне везе присутне у целулозном ланцу и тиме деполимеризују целулозу. Целобихидролазе, које се још називају и егзоглуканазе, доводе до раскидања веза на крајевима целулозних ланаца, ослобађајући молекуле целобиозе. Након тога,  $\beta$ -глукозидазе катализују превођење целобиозе у глукозу [118]. Разградња хемицелулозе применом ензима одвија се на сличан начин. Међутим, због хетерогеног састава, у каснијим корацима хидролизе до простих шећера неопходно је користити више различитих ензима. Најважнији ензими из групе хемицелулаза су енто-1,4- $\beta$ -ксиланаза, која раскида везе унутар ксилана и преводи га у олигосахариде, и 1,4- $\beta$ -ксилозидаза, која настале олигосахариде преводи у ксилозу [119]. За потпуну разградњу хемицелулозе користе се и ксилан естераза,  $\alpha$ -1-арабинофуранозидаза и  $\alpha$ -О-4-метил глукурозидаза, које делују синергистички и доводе до ефикасне хидролизе ксилана и манана [118].

Механизам разградње лигнина применом ензима се заснива на стварању реактивних врста, попут фенокси радикала. За настајак реактивних врста користе се ензими из групе оксидоредуктаза, лаказе и хем пероксидазе – лигнин пероксидаза, манган пероксидаза, версатилна пероксидаза, пероксидаза за обезбојавање боја и верзатил (хибридна) пероксидаза. Лаказе су ензими из групе полифенолоксидаза, који се због четири атома бакра у својој структури називају још и плави мултибакарни ензими. Имају способност да разграђују велики број комплексних органских једињења, попут моно-, ди- и полифенола, различитих деривата

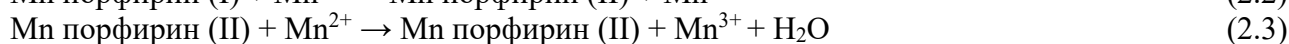
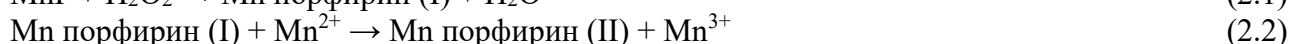
фенола, ароматичних и алифатичних амина, као и фенолних и нефенолних једињења присутних у лигнину [120]. Лаказе за свој каталитички циклус користе молекулски кисеоник и редукују га до воде, уз истовремено оксидовање поменутих органских једињења. Оксидовање ароматичних молекула се заснива на редокс својствима бакра присутног у лакази. Оксидовањем фенолних супстрата настају нестабилни фенокси радикали, који доводе до раскидања алкил-арил и C $\alpha$ -C $\beta$  веза у лигнину [121]. Оксидовање нефенолних једињења врши се уз присуство медијатора, једињења која повећавају редокс потенцијал ензима и тиме олакшавају оксидовање супстрата. За разлику од лаказа, за каталитички циклус ензима из групе хем пероксидаза неопходан је водоник пероксид [41]. Лигнин пероксидазе у свом активном центру садрже протопорфиринску групу гвожђа и хем групу. Ове ензиме карактерише највећи редокс потенцијал међу хем пероксидазама. Каталитичка активност лигнин пероксидазе се заснива на постојању остатака триптофана, захваљујући којима ови ензими могу истовремено оксидовати и фенолна и нефенолна ароматична једињења која улазе у састав лигнина [122]. До делигнификације долази кидањем C-O-C и C-C веза услед оксидације лигнина, док полисахариди остају нетакнути. Иако не захтева присуство медијатора, у присуству вератарил алкохола се повећава активност лигнин пероксидазе [123]. Пероксидазе за обезбојавање боја представљају недавно откривену групу пероксидаза, које осим лигнина могу разградити и различите типове боја [124]. Активни центар ових пероксидаза садржи молекул аспарагинске киселине, захваљујући којој долази до оксидације [125]. Верзатил или хибридна пероксидаза представља хибрид лигнин пероксидазе и манган пероксидазе. Наиме, овај ензим има способност оксидовања супстрата карактеристичних за лигнин пероксидазу, попут вератрил алкохола и метоксибензена, али и Mn<sup>2+</sup>, који је неопходан у каталитичком циклусу манган пероксидазе. Осим тога, у одсуству супстрата, овај ензим има способност разградње азо боја, попут пероксидазе за обезбојавање [126]. Верзатил пероксидаза је по структури слична манган пероксидази, јер поред два Ca<sup>2+</sup> места садржи и два места за везивање Mn<sup>2+</sup> [127].

Манган пероксидаза (Mn (II) водоник пероксид оксидоредуктаза, EC 1.11.1.13, Mn пероксидаза) је поред лигнин пероксидазе најзаступљенија пероксидаза која има способност модификовања лигнина. Први пут је изолована из гљиве *Phanerochaete chrysosporium* пре више од три деценије [128]. Производе је различите врсте гљива изазивача белог труљења (базидиомицете). Молекулска маса Mn пероксидазе креће се у опсегу од 38 kDa до 62,5 kDa. Код високо пречишћених ензима молекулска маса износи око 45 kDa, са изоелектричном тачком око 3,55 [129]. Овај ензим показује активност у температурном опсегу од 5 °C до 70 °C, а највећу активност постиже на 50 °C до 60 °C. По својој структури спада у гликопротеине који садрже хем групу и око 350 аминокиселинских остатака [130]. Осим хем групе, Mn пероксидаза садржи и десет великих хеликса, два мала хеликса, пет дисулфидних мостова и два Ca<sup>2+</sup> јона који одржавају структуру активног места. Активно место Mn пероксидазе се састоји из различитих аминокиселина. Проксимални хистидин има улогу лиганда и повезан је са R остатком аспарагинске киселине водоничним везама. Остаци хистидина и аргинина са бочне стране формирају место везивања супстрата [131]. Овај ензим карактерише кристална структура, унутар које постоји само једно место за везивање Mn<sup>2+</sup>, а састоји се из два молекула воде, три кисела лиганда (аспартамска киселина 179, глутаминска киселина 35 и глутаминска киселина 39) и хем пропионата [132]. На слици 2.11. приказана је структура Mn пероксидазе и њеног активног места.



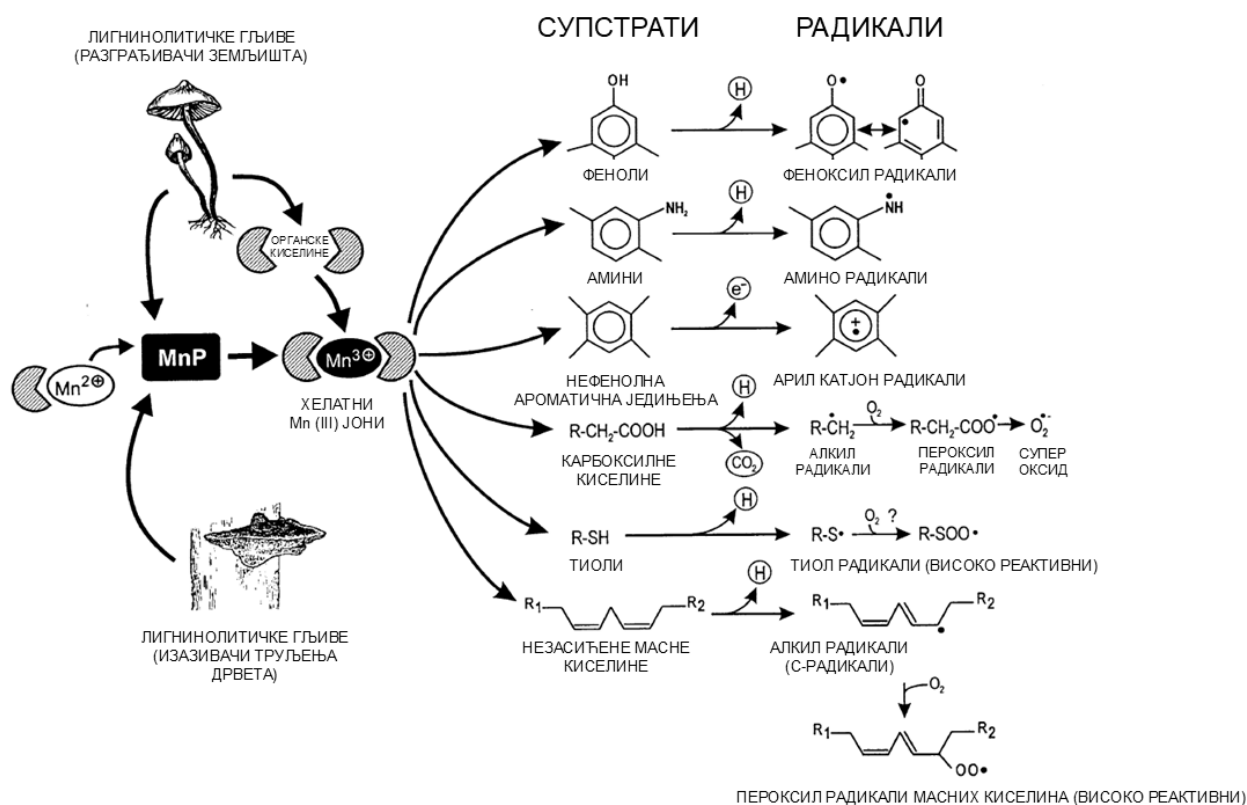
Слика 2.11. Структура манган пероксидазе (преузето и прилагођено према [132,133])

Специфично својство Mn пероксидазе је способност да делује и као оксидаза и као пероксидаза [133]. Као и у случају осталих пероксидаза, каталитички циклус Mn пероксидазе започиње у присуству водоник пероксида, који се везује за гвожђе у ензиму, формирајући гвожђе-пероксид комплекс. Преношењем два електрона из хем групе раскидају се везе између два атома кисеоника у молекулу водоник пероксида и настаје први интермедијар –  $\text{Fe}^{4+}$ -оксо-порфирин радикал. Током овог процеса се ослобађа један молекул воде, након чега настаје други интермедијар –  $\text{Fe}^{4+}$ -оксо-порфирин комплекс. Хелатни  $\text{Mn}^{2+}$  донира један електрон новонасталом интермедијару и на тај начин се оксидује до  $\text{Mn}^{3+}$ . У следећем кораку долази до редукције интермедијара II, уз оксидовање још једног  $\text{Mn}^{2+}$  до  $\text{Mn}^{3+}$  и ослобађање још једног молекула воде [134]. Овај процес се може представити низом консекутивних реакција [135]:



При високим концентрацијама водоник пероксида може доћи до реверзибилне инактивације ензима формирањем трећег интермедијара, који не поседује каталитичку активност [136]. Са друге стране, у одсуству водоник пероксида каталитички циклус може започети и у присуству карбоксилних киселина. Наиме, хелатни  $\text{Mn}^{3+}$  јон може да реагује са карбоксилним киселинама, попут оксалне или јабучне киселине, стварајући алкил радикале. Алкил радикали даље спонтано реагују са кисеоником, при чему настају други кисеонични радикали. Радикали настали у овој аутокатализованог реакцији представљају добар извор пероксида које Mn пероксидаза може користити као оксидационо средство у одсуству водоник пероксида [134]. Осим карбоксилних киселина, Mn пероксидаза има способност стварања различитих типова радикала, у зависности од присутног супстрата. Заједничко свим овим радикалима је да делују синергистички и потпомажу разградњу лигнина. Механизам настајања појединих радикала деловањем Mn пероксидазе приказан је на слици 2.12.

Mn пероксидаза има веома важну улогу у иницијалној фази разградње лигнина. До разградње долази услед оксидовања фенолних и нефенолних фракција лигнина, при чему настају различита фенолна (3-етилтиазолин-6-сулфонат, 2,6-диметилхидроксифенол сиригол, гвајакол) и нефенолна једињења [137]. Биолошка разградња лигнина се у основи одвија по механизму Фентон реакције, која припада групи напредних оксидационих процеса [138].

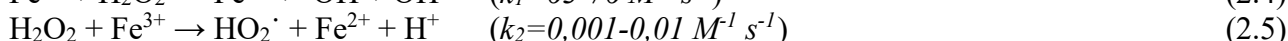
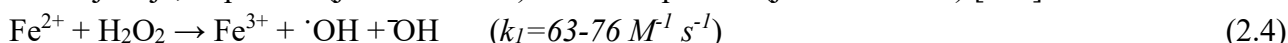


Слика 2.12. Механизам настајања радикала који имају способност разградње лигнина (преузето и прилагођено према [135])

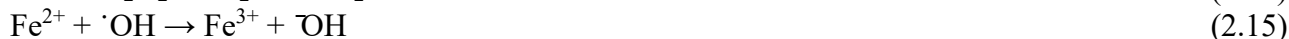
### 2.3.5. Напредни оксидациони процеси

Напредни оксидациони процеси (енгл. *Advanced Oxidation Processes*) су високо ефикасне технике за разградњу комплексних органских једињења која се тешко разграђују под дејством конвенционалних спољних агенаса. Концепт напредних оксидационих процеса је установљен крајем XX века, са циљем разградње органских загађивача присутних у води и отпадним водама. Захваљујући сличној структури лигнина и ових загађивача, напредни оксидациони процеси се све чешће примењују и као третмани за делигнификацију биомасе [139]. Ови процеси се заснивају на стварању хидроксил радикала ( $\cdot\text{OH}$ ) који разграђује комплексну лигноцелулозну структуру оксидацијом која се одвија при великим брзинама реакције (у опсегу од  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  до  $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [140]. У напредне оксидационе процесе се убрајају Фентон процес, озонизација, влажна оксидација, фотохемијска оксидација и електрохемијска оксидација. У зависности од медијума који се користи током третмана, третман ултразвуком и третман микроталасима се такође могу сврстати у ову групу. Осим тога, по механизму делигнификације се и третман алкалним водоник пероксидом може сматрати напредним оксидационим процесом.

*Фентон процес* или оксидација применом Фентоновог реагенса се заснива на реакцији водоник пероксида и јона гвожђа ( $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Fe}^{3+}$ ) у киселој средини [141]. У зависности од јона гвожђа који су присутни у Фентоновом реагенсу, хидроксил радикал може настати у реакцији иницијације, директно (једначина 2.4) или индиректно (једначина 2.5) [142]:



Након стварања хидроксил радикала, оксидација применом Фентоновог реагенса се одвија по Хабер-Вајсовом механизму, низом од двадесетак ланчаних реакција. Током ових реакција настају различити типови кисеоничних радикала – хидроксил радикал, водоник пероксид и супероксид, али и других радикалских врста. Неке од ових реакција су приказане једначинама 2.6-2.15 [143,144]:



Реакције у којима долази до регенерисања  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  јона и стварања нових радикалских врста (једначине 2.9-2.13) називају се Фентон-сличне реакције. Реакције представљене једначинама 2.14 и 2.15 су инхибиторне реакције којима се зауставља процес делигнификације биомасе. Како би се избегло одвијање инхибиторних реакција, неопходно је пажљиво доzirати количину јона гвожђа, а пре свега  $\text{Fe}^{2+}$  јона, и тиме контролисати трошење хидроксил радикала [145]. Осим количине јона гвожђа, процесни параметри који утичу на ефикасност делигнификације су и концентрација водоник пероксида, рН вредност, дужина трајања процеса, као и температура на којој се процес одвија. Фентон процес се најчешће одвија на собној или умерено повишеној температури, те је за постизање жељене ефикасности потребно повећати дужину трајања третмана [140]. Ефикасност третмана се може повећати и применом катализатора. Према типу катализатора који се користи, Фентон процес може бити хомоген или хетероген. Хомогени Фентон процес подразумева употребу соли гвожђа (попут гвожђе-сулфата или гвожђе-хлорида) који делују као катализатори када се процес одвија на рН~3. Међутим, уколико се процес одвија на рН вредности вишој од 3, у систем је неопходно увести нове катализаторе, попут зеолита, активног угља и различитих полимера. Захваљујући својим адсорбентским својствима, ови катализатори се уједно могу користити и као носачи јона гвожђа током извођења третмана [143]. Такође, делигнификација се може катализовати и у присуству ултравиолетног (UV) зрачења, у процесу фотокатализе. Фотокатализом долази до редукције  $\text{Fe}^{3+}$  јона у  $\text{Fe}^{2+}$  јоне, чиме се поспешује даље стварање хидроксил радикала [146]. Фентон процес катализован UV зрачењем се назива још и фото-Фентон процес.

*Фотокатализа* подразумева употребу зрачења за иницирање селективне оксидације. Фотосензитивни молекули апсорбовањем зрачења из UV или видљивог дела спектра добијају довољну количину енергије за јонизацију, а затим ову енергију преносе и на суседне молекуле [147]. На овај начин може доћи до селективне разградње лигноцелулозне биомасе при значајно блажим условима у односу на друге третмане. Са друге стране, применом светлосне енергије може доћи и до побуђивања електрона, уз стварање региона са позитивним наелектрисањем ( $h^+$ ). Побуђени електрони и позитивно наелектрисани региони у присуству влаге реагују са молекулима воде, при чему настају кисеонични радикали, попут хидроксил, пероксил и супероксид радикала [139]. Ови радикали затим оксидују лигнин и полисахариде и доводе до деполимеризације лигноцелулозе. Фотокатализа може бити хомогена, када се као катализатори користе комплекси метала, или хетерогена, која подразумева употребу полупроводника, попут титанијум-оксида, цинк-оксида или гвожђе-(III)-оксида [148]. Хетерогена фотокатализа се чешће користи за третман биомасе због олакшања издвајања катализатора након третмана.

*Електрохемијска оксидација* је високо селективан процес за разградњу лигноцелулозе, пре свега за деполимеризацију лигнина. Овај процес не захтева примену додатних реагенаса, а као споредни производ најчешће настаје само вода. У зависности од материјала од којег је анода израђена, као и од присутних електролита, до оксидације долази или услед разлике у потенцијалима између катоде и аноде или под дејством електричног поља. У оба случаја долази до стварања хидроксил радикала и других кисеоничних врста, које доводе до кидања С-С веза и стварање нових ароматичних радикала који поспешују разградњу [149]. На овај начин се могу третирати велике количине узорка. Међутим, како се процес изводи искључиво шаржно,

а аноде које се користе су често веома скупе, скалирање овог типа третмана на индустријски ниво подразумева велике капиталне трошкове [139].

Третман применом алкалног водоник-пероксида се користи за уклањање хемицелулозе и лигнина, чиме се повећава површина целулозе доступна ензимима. За разлику од конвенционалног киселог третмана водоник-пероксидом, овај третман се одвија на рН вредности око 11,5. Алкална средина је неопходна за производњу хидроксил радикала и других кисеоничних врста, које не настају када се користи кисели раствор водоник-пероксида [150]. Настале врсте доводе до раскидања естарских, етарских и  $\beta$ -арил етарских веза присутних у лигнину, уз истовремено ослобађање хемицелулозе. Механизам разградње лигноцелулозе применом алкалног водоник-пероксида се може представити следећим једначинама [139]:



На сваки мол водоник пероксида настаје 0,5 мола кисеоника, уколико друга једињења не реагују са новонасталим радикалима. Међутим, како је водоник-пероксид нестабилан у алкалној средини, уколико су у систему присутни и прелазни метали, попут мангана, гвожђа или бабра, тада долази и до следећих реакција [151]:



Механизам настајања хидроксил радикала се може уопштено представити једначином:



На ефикасност третмана алкалним водоник-пероксидом највећи утицај има рН вредност система, уз концентрацију водоник-пероксида, температуру и дужину трајања третмана [152]. Како би се повећала ефикасност делигнификације, за загревање се користе алтернативни извори топлоте, или се сам третман комбинује са другим техникама у бројним неконвенционалним третманима.

### 2.3.6. Неконвенционални третмани

Неконвенционални третмани представљају унапређене технике чији је основни циљ постизање ефикасне разградње лигноцелулозе на прихватљивији начин у погледу одрживости у односу на конвенционалне третмане. Ови третмани често подразумевају комбинацију два или више конвенционалних третмана и/или увођење додатних. Неки од најчешће комбинованих неконвенционалних третмана приказани су на слици 2.9. у оквиру одељка 2.3. Одабир типа и процесних услова третмана се врши тако да се превазиђу недостаци постојећих третмана. Ови недостаци се углавном односе на количину енергије коју је потребно уложити, дужину трајања третмана, као и количину реагенаса која се користи за извођење третмана. Најчешће, неконвенционални третмани настају комбиновањем хемијског третмана са алтернативним изворима топлотне енергије, попут примене микроталаса или ултразвука. На овај начин се значајно скраћује дужина трајања третмана, док синергизам примењених третмана доприноси њиховој ефикасности. У табели 2.3. дат је приказ најзначајнијих неконвенционалних третмана кукурузне стабљике.

Нетермална плазма се може користити за третирање биомасе на нове начине, самостално и у комбинацији са другим технолошким процесима. Током третмана нетермалном плазмом долази до стварања бројних кисеоничних радикала, уз хидроксил радикал, што ову технику убраја у напредне оксидационе процесе. Како ови радикали настају и у води, сам процес се може изводити и без примене других реагенаса. Осим тога, током третмана нетермалном плазмом долази и до фотокатализе, услед присуства плазмом створеног UV зрачења. Ова својства чине плазму погодном техником за развој нових неконвенционалних третмана лигноцелулозне биомасе.

Табела 2.3. Преглед одабраних неконвенционалних третмана кукурузне стабљике

Третман	Процесни услови	Исход третмана	Реф.
Алкални третман/AFEX	Стабљика је натопљена 30% (мас.) раствором водоник пероксида на собној температури, а затим је третирана амонијаком у високопритисном реактору током 10 min, на различитим температурама	Највећи степен делигнификације од 28,9% је остварен на температури од 130°C, док је највиши принос глукозе (96,8%) и ксилозе (96,8%) остварен на температури од 90 °C	[153]
Кисело-алкални третман	Стабљика је третирана разблаженом киселином и алкалним раствором натријум-сулфита на 140 °C и 150 °C, уз варирање концентрације киселине (0,8%, 1,0% и 1,2% (мас.))	Остварен је степен делигнификације од 85%, уз рекулперацију око 93% хемицелулозе; након 72-часовне ензимске хидролизе је око 85% целулозе преведено у глукозу	[154]
Алкално-физички третман	Стабљика је умешана са чврстим базама (NaOH и Ca(OH) <sub>2</sub> ) у различитим односима, након чега је чврсто-чврсто смеша млевена у кугличном млину током 1 h	Додавањем 15% (мас.) натријум-хидроксида у самлевену стабљику остварена је делигнификација од 74%, а истовремено је уклоњено 66% хемицелулозе	[155]
Алкално-биолошки третман	Стабљика је инокулисана бактеријском суспензијом <i>R. ornithinolytica</i> RS-1 и инкубирана током 7 дана на 28°C, а затим је третирана раствором натријум-хидроксида различитих концентрација током 2 h, на 80 °C	Биолошким третманом уклоњено је 19% лигнина, а садржај целулозе је повећан за 21%; ензимском хидролизом узорка након накнадног алкалног третмана остварен је степен конверзије целулозе од 48,6%	[156]
Алкални/Фентон третман	Фентон третман је вршен применом реагенса који је садржао FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O и H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> у односу 1:25, током 48 h, на 35 °C; алкални третман је вршен применом раствора натријум-хидроксида, током 1,5 h, на 90 °C	Највиши остварени степен делигнификације је износио 88%, уз уклањање 80% хемицелулозе; након ензимске хидролизе, принос глукозе је износио 65%	[157]
Алкални/третман јонским течностима	Стабљика је натопљена 1% (мас.) раствором натријум хидроксида током 1 h на 90 °C, а затим је третирана 1-бутил-3-метилимидазолијум хлоридом током 2 h, на 130 °C	Алкални третман је уклонио око 75% лигнина и око 37% хемицелулозе, док је додатком јонске течности степен делигнификације порастао за свега 2%; применом комбинованог третмана остварен је принос глукозе од 96% након само 5 h од почетка ензимске хидролизе	[158]

Табела 2.3. Преглед одабраних неконвенционалних третмана кукурузне стабљике (наставак)

Третман	Процесни услови	Исход третмана	Реф.
DES третман у присуству киселог и базног катализатора	Стабљика је третирана смешом сачињеном од 1,4-бутандиола и холин хлорида, уз додаток $\text{AlCl}_3$ као киселог, односно $\text{NaOH}$ као базног катализатора; третман се одвијао 3 h на $100\text{ }^\circ\text{C}$	Највише лигнина (81,3%) уклоњено у присуству 4% (мас.) $\text{NaOH}$ ; ензимског хидролизом овог узорка принос глукозе је износио 90,7%	[159]
DES/ $\text{FeCl}_3$ третман	Стабљика је третирана 60% (мас.) еутектичком смешом, сачињеном од холин хлорида и N-(2-хидроксиетил)етилендиаминa и 0,5% (мас.) раствором $\text{FeCl}_3$ током 50 min на $110\text{ }^\circ\text{C}$	Уклоњено је 87% лигнина и око 56% ксилана; ефикасност ензимске хидролизе након третмана је повећана око 5,5 пута, резултујући приносом редукујућих шећера од 98,6%	[160]
DES/ултразвук/микроталаси	Стабљика је помешана са терцијарном еутектичком смешом, сачињеном од холин хлорида и различитих HBD, а затим је суспензија третирана ултразвуком и микроталасима, уз варирање процесних параметара	Комбинованим третманом је уклоњено око 63% лигнина и око 91% хемицелулозе, док је садржај целулозе у резидуалној биомаси повећан на 76%	[161]
Третман применом $\text{KMnO}_4$ и етанола	Стабљика је најпре третирана 1% (мас.) раствором $\text{KMnO}_4$ од 30 min до 120 min, на $40\text{ }^\circ\text{C}$ , након чега је уследио третман етанолом концентрације 50-60% (мас.) током 90 min, на $175\text{ }^\circ\text{C}$ до $195\text{ }^\circ\text{C}$	Најбољи резултати су остварени комбиновањем третмана раствором $\text{KMnO}_4$ у трајању од 60 min, на $40\text{ }^\circ\text{C}$ и третмана етанолом концентрације 50% (мас.) на $185\text{ }^\circ\text{C}$ током 90 min; ензимском хидролизом третиране стабљике остварена је конверзија глукана од 90% и ксилана од 85%	[162]
Хидротермални третман/ултразвучна екстракција етанолом	Хидротермални третман се одвијао на $180\text{ }^\circ\text{C}$ и 10 bar током 70 min, након чега је уследио третман 50% (мас.) етанолом уз примену ултразвука, на различитим температурама и при различитим дужинама трајања третмана	Применом чистог хидротермалног третмана је уклоњено око 75% хемицелулозе, а применом комбинованог третмана је уклоњено чак 90% хемицелулозе и око 46% лигнина	[163]
Третман ултразвуком и лаказама	Стабљика је помешана са лаказом и добијена смеша је подвргнута третману ултразвуком у трајању од 0 min до 30 min, при снази од 0 W до 50 W и фреквенцији од 18 kHz до 30 kHz, у температурном опсегу од $25\text{ }^\circ\text{C}$ до $80\text{ }^\circ\text{C}$	При оптималним условима третмана (pH 5, $400\text{ IU mL}^{-1}$ , $48\text{ }^\circ\text{C}$ и 5 h) остварен је степен делигнификације од 80,6%	[164]

## 2.4. Појам гасне плазме

Плазма представља јонизовано стање материје које се одликује присуством слободних електрона, јона и неутралних честица, као и колективним електромагнетним понашањем. Термин „плазма“ увео је Ирвинг Ленгмир (енгл. *Irving Langmuir*) 1928. године, описујући јонизовани гас са специфичним електричним и динамичким својствима.

Плазма настаје делимичним или потпуним јонизовањем гаса, при чему се електрони ослобађају из атома или молекула, док преостале честице постају позитивно наелектрисани јони [165]. Процес јонизације може бити изазван различитим механизмима, као што су повећање температуре, деловање електричних и магнетних поља, електромагнетно зрачење или судари честица [162]. За разлику од класичне термичке трансформације агрегатних стања, прелаз у плазмено стање није нужно повезан искључиво са повећањем температуре, већ може настати и под дејством електричних поља или зрачења.

Плазму карактерише присуство различитих врста честица, укључујући електроне, јоне, неутралне атоме и молекуле, као и оне у побуђеним стањима. Иако појединачне честице могу носити електрично наелектрисање, плазма у целини испуњава услов квази-неутралности, при чему су густине позитивних и негативних наелектрисања приближно једнаке [166]. Физичка својства плазме одређена су концентрацијом и расподелом наелектрисаних честица, њиховом енергијом и температуром, као и интеракцијама са електромагнетним пољима. Степен јонизације у конвенционалним плазма системима креће се у опсегу од  $10^{-7}$  до  $10^{-4}$ , док је висок степен јонизације је карактеристичан за високотемпературне плазме, као што су термонуклеарни системи, где се говори о готово потпуно јонизованој плазми. Насупрот томе, плазма која се користи у плазма-хемијским процесима је најчешће слабо јонизована, са релативно ниским степеном јонизације [165].

У присуству електричног поља, електрична енергија се у плазменом систему најпре акумулира у електронима, а затим се путем сударних процеса делимично преноси на тешке честице (јоне и неутралне честице). Због значајно мање масе електрона у односу на тешке честице, пренос енергије је ограничен, што доводи до тога да температура електрона може бити знатно виша од температуре тешких честица. Уколико се кроз интензивне сударе успостави температурна равнотежа између електрона и тешких честица, говори се о *термалној*, односно *равнотежној плазми*. Међутим, већина практичних плазмених система функционише изван термодинамичке равнотеже, при чему је температура електрона значајно виша од температуре тешких честица. Овај тип плазме назива се *нетермална*, односно *неравнотежна плазма* [165]. За разлику од термалне плазме, која се примењује, између осталог, у процесима гасификације биомасе и производњи енергије, нетермална плазма има широку примену у плазма-хемији, заштити животне средине, медицини, обради површина материјала и другим областима [164–166]. У табели 2.4. приказана су физичко-хемијска својства термалне и нетермалне плазме.

Табела 2.4. Својства термалне и нетермалне плазме [167,168]

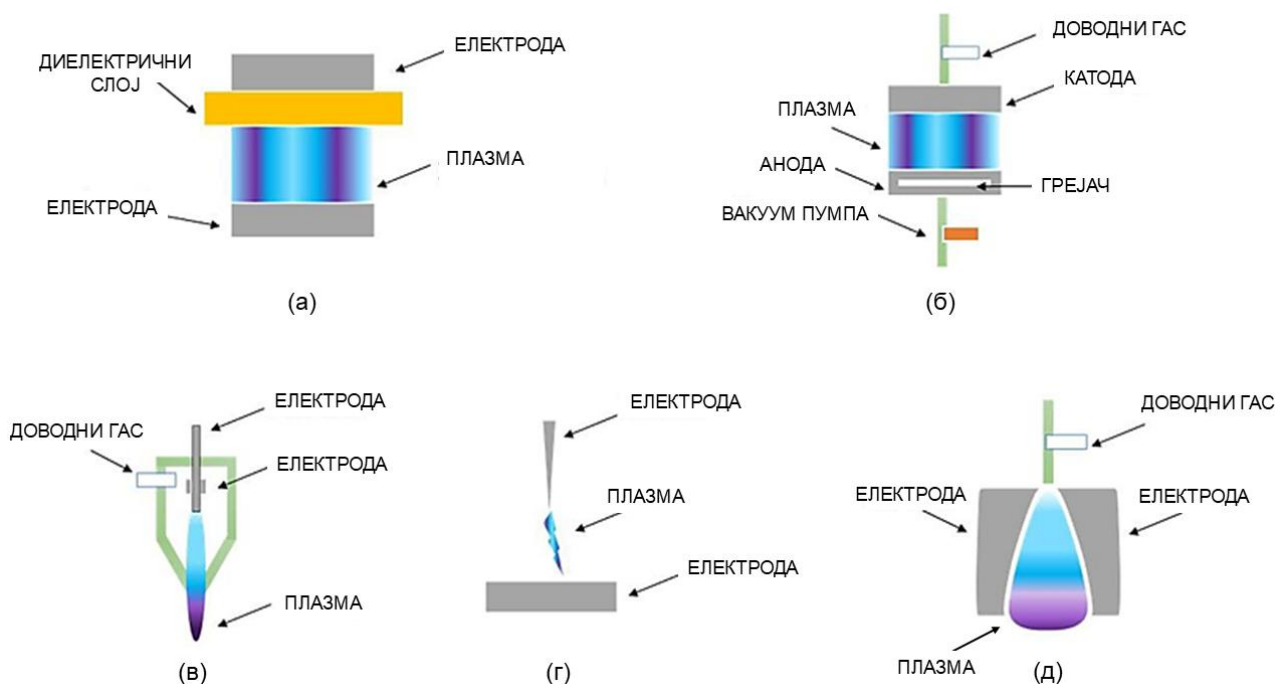
Својство	Термална плазма	Нетермална плазма
Температура плазме	$2 \cdot 10^4$ К	300 - 1 000 К
Термичка равнотежа	$T_e \approx T_i \approx T_n$	$T_e \gg T_i, T_n$
Температура електрона	1 eV	1-10 eV
Густина електрона	$> 10^{21} - 10^{26} \text{ m}^{-3}$	$< 10^{19} \text{ m}^{-3}$
Притисак	$\approx 101 \text{ kPa}$	$\leq 0 \text{ kPa}$
Напон	10 - 100 kV	0,5 - 50 kV
Интензитет електричне струје	30 - 3 000 А	$10^{-5} - 1 \text{ A}$
Напојни гас	Ваздух, азот	Азот, кисеоник, ваздух, племенити гасови

$T_e$  – температура електрона;  $T_i$  – температура јона;  $T_n$  – температура неутралних честица (атома, молекула, радикала)

### 2.4.1. Третман нетермалном плазмом

Нетермална плазма представља плазмено стање материје у којем постоји значајна разлика између температуре електрона и температуре тешких честица (јона и неутралних молекула), при чему је температура електрона знатно виша ( $T_e \gg T_i, T_n$ ). Она се најчешће генерише електричним пражњењем у гасу под дејством електричног поља, при атмосферском или сниженом притиску, док температура гаса остаје близу амбијенталне [169]. Електрично пражњење настаје услед примене разлике потенцијала између електрода или делова електричног система, при чему се енергија електричног поља првенствено акумулира у електронима. У зависности од типа напајања, плазма се може генерисати применом једносмерног напона, наизменичног напона у широком фреквенцијском опсегу (од ниских фреквенција до радио-фреквенцијског и микроталасног подручја), као и импулсних извора високог напона [162].

У складу са типом напајања и геометријом електрода, развијен је велики број конфигурација нетермалне плазме. Најзначајније и најчешће примењиване конфигурације обухватају диелектрично баријерно пражњење (енгл. *Dielectric Barrier Discharge, DBD*), корона пражњење, импулсно пражњење, клизећи лук (енгл. *gliding arc*), микроталасно пражњење, као и плазма млазнице и плазма игле [170]. Поред наведених, постоје и бројне хибридне конфигурације, чија су својства прилагођена специфичним захтевима процеса и карактеристикама третираног материјала. Нетермална плазма се може генерисати како при атмосферском притиску, тако и при сниженим притисцима. У случају нископритисних плазми, неопходна је употреба вакуумских система, што повећава техничку сложеност и трошкове процеса [167]. Насупрот томе, атмосферска нетермална плазма омогућава једноставнију примену и интеграцију у индустријске и лабораторијске системе. Са аспекта технолошке применљивости, конфигурације као што су диелектрично баријерно пражњење и плазма игла издвајају се као релативно једноставни и флексибилни извори нетермалне плазме, што их чини погодним за примену на различитим нивоима технолошке спремности (енгл. *Technology Readiness Levels*). На слици 2.13. приказане су најзаступљеније конфигурације нетермалне плазме.

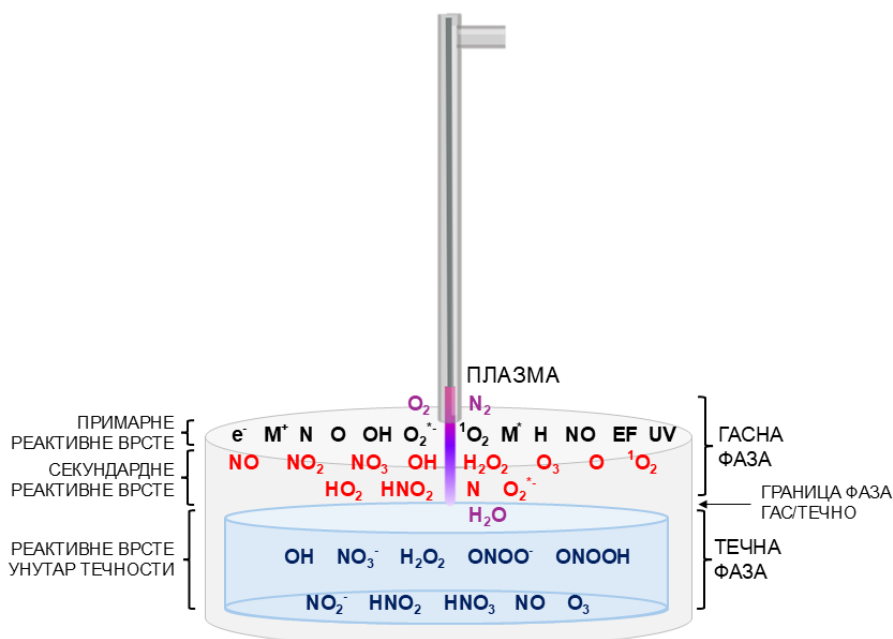


Слика 2.13. Различите конфигурације плазме: а) диелектрично баријерно пражњење, б) светлосни зрак, в) плазма игла, г) корона пражњење, д) клизећи лук (преузето и прилагођено према [171])

Без обзира на конфигурацију, принцип деловања гасне плазме током наших третмана заснива се доминантно на формирању реактивних кисеоничних врста (енгл. *Reactive Oxygen Species, ROS*) и реактивних азотних врста (енгл. *Reactive Nitrogen Species, RNS*), које се у литератури често називају и реактивне кисеонично-азотне врсте (енгл. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species, RONS*). Тип реактивних врста које ће настати зависи од доводног гаса који се користи за генерисање нетермалне плазме. Из практичних разлога, третман плазмом на атмосферском притиску се најчешће реализује у ваздуху. Као доводни гас се углавном бира аргон, због ниже цене, док је хелијум мање заступљен. Када се за генерисање плазме користи аргон, око самог извора плазме налази се мешавина ваздуха и аргона, која представља радни гас у коме долази до гасног пражњења. У том случају, радни гас има кључну улогу у садржају насталих реактивних врста. Аргон не поседује енергију потребну за јонизовање азота, што резултује у плазми која има нижи садржај нитратних јона. Међутим, његовом применом могу се генерисати значајне количине водоник пероксида и хидроксил радикала, који настају у плазми ниже проводљивости, али више рН вредности у односу на плазму генерисану у компримованом ваздуху [172]. Осим доводног гаса, тип насталих врста одређује и начин примене плазме, односно да ли је у директном контакту са чврстим узорком или са суспензијом узорка у одговарајућем медијуму. Током директног третмана реактивне врсте настају на граници фаза чврсто/гас. Доминантна врста која настаје на овај начин је атомски кисеоник, који се ствара дисоцијацијом кисеоника или угљеник (IV) оксида присутних у непосредној околини плазме [170]. Атомски и молекулски кисеоник и озон имају способност модификовања третираних површина оксидацијом, што директан третман чини погодним за примену у стерилизацији и деконтаминацији површина у медицинским установама и постројењима фармацеутске и прехранбене индустрије. Осим тога, може се користити и у третирању рана, затим за поспешивање регенерације ткива, подстицање коагулације крви, као и у стоматологији [173–175]. Такође, директним излагањем материјала нетермалној плазми модификује се површина третираног материјала, утиче се на хидрофобност и обезбеђује се квалитетнија и постојанија штампа/бојење материјала [176]. Применом третмана у течном медијуму, најчешће води, настаје већи број реактивних врста и третман се може прилагодити различитим типовима узорака. Механизам настајања реактивних врста у течном медијуму се може приказати најбоље на примеру плазма активираних воде.

#### 2.4.2. Плазма активираних вода

Плазма активираних вода (енгл. *Plasma Activated Water, PAW*) је вода богата реактивним врстама, специфичних физичко-хемијских карактеристика. PAW настаје када се вода изложи дејству нетермалне плазме. У зависности од конфигурације, извор плазме може бити смештен изнад површине воде или уроњен у воду, што одређује тип реактивних врста које ће настати. Урањањем извора плазме у воду настају само врсте карактеристичне за течну фазу. Применом плазме изнад површине воде настаје већи број различитих врста које настају у гасној фази, течној фази и на граници фаза гас/течно. Општи приказ реактивних врста које настају применом плазме изнад површине воде дат је на слици 2.14.



Слика 2.14. Процес настанка кисеоничних и азотних реактивних врста у гасовитој и течној фази плазма активирание воде (преузето и прилагођено према [177])

Излагањем воде нетермалној плазми започиње низ ланчаних хемијских реакција којима настају примарне и секундарне реактивне врсте. Врсте настале у гасној фази прелазе у течну фазу, покрећући нове реакције у течној фази и на граници фаза гас/течно. Стабилне врсте реагују са другим присутним врстама, као и са молекулама воде, градећи нове врсте. Нестабилне врсте се распадају, што иницира нове реакције и настанак нових врста. Хемијске реакције настајања и нестајања, односно трошења кисеоничних и азотних реактивних врста у води активираниој нетермалном плазмом приказане су у табели 2.5.

Табела 2.5. Хемијске реакције настајања и нестајања најважнијих кисеоничних и азотних реактивних врста током активирања воде нетермалном плазмом [177–181]

Реактивна врста	Реакција настајања	Реакција трошења
Водоник пероксид ( $H_2O_2$ )	$OH^\cdot + OH^\cdot \rightarrow H_2O_2$ $HO_2^\cdot + HO_2^\cdot \rightarrow H_2O_2 + O_2$	$H_2O_2 + UV \rightarrow OH^\cdot + OH^\cdot$ $OH^\cdot + H_2O_2 \rightarrow HO_2^\cdot + H_2O$ $H_2O_2 + H^+ + NO_2^\cdot \rightarrow ONOOH + H_2O$
Хидроксил радикал ( $OH^\cdot$ )	$H_2O + e^- \rightarrow \cdot OH + H^\cdot + e^-$ $H_2O + e^- \rightarrow H^+ + \cdot OH + 2e^-$ $H_2O + M^* \rightarrow H^+ + \cdot OH + M$ $H_2O + UV \rightarrow H_2O^\cdot$ $H_2O^\cdot + UV \rightarrow H^+ + OH^\cdot$ $OH^\cdot \rightarrow OH^\cdot + e^-$ $H_2O_2 + UV \rightarrow OH^\cdot + OH^\cdot$ $e^- + O_2 \rightarrow O(^3P) + O(^1D)$ $O(^1D) + H_2O \rightarrow 2OH^\cdot$ $O_2 + H^+ \rightarrow OH^\cdot + O$ $NO + HO_2^\cdot \rightarrow OH^\cdot + NO_2$ $HNO_3 \rightarrow NO_2^\cdot + OH^\cdot$	$OH^\cdot + OH^\cdot \rightarrow H_2O_2$ $OH^\cdot + H_2O_2 \rightarrow HO_2^\cdot + H_2O$ $OH^\cdot + O_3 \rightarrow HO_2^\cdot + O_2$ $N + OH^\cdot \rightarrow NO + H^\cdot$ $OH + NO_2 \rightarrow [O=N-OOH]$ $[O=N-OOH] \rightarrow \cdot O=N-OO^\cdot + H^+$ $NO + OH^\cdot \rightarrow HNO_2$ $HNO_2 + OH^\cdot \rightarrow NO_2 + H_2O$ $NO_2^\cdot + OH^\cdot \rightarrow HNO_3$
Супероксид ( $O_2^{\cdot -}$ )	$e^- + O_2 \rightarrow O_2^{\cdot -}$ $OH + HO_2^\cdot \rightarrow O_2^{\cdot -} + H_2O$ $ONOO^\cdot \rightarrow NO^\cdot + O_2^{\cdot -}$	$O_2^{\cdot -} + N_2 \rightarrow O_2 + N + N$ $O_2^{\cdot -} + N \rightarrow NO_2$ $O_2^{\cdot -} + NO^\cdot \rightarrow ONOO^\cdot$
Синглетни кисеоник ( $^1O_2$ )	$O_2 + e^- \rightarrow ^1O_2$ $O + O \rightarrow ^1O_2$	$O^\cdot + ^1O_2 \rightarrow O_3 + e^-$ $O^\cdot + ^1O_2 \rightarrow O(^3P) + O_2^\cdot$

Табела 2.5. Хемијске реакције настајања и нестајања најважнијих кисеоничних и азотних реактивних врста током активирања воде нетермалном плазмом (наставка)

Реактивна врста	Реакција настајања	Реакција трошења
Атомски кисеоник ( $O$ )	$O_2 + e^- \rightarrow 2O + e^-$ $O_2 + M^* \rightarrow 2O + M$ $O_2 + H \rightarrow OH + O$ $H_2O + e^- \rightarrow H + O + H + e^-$ $N + O_2 \rightarrow NO + O$	$O + O_2 + M \rightarrow O_3 + M$ $O + O + M \rightarrow O_2 + M$ $O + N_2 \rightarrow NO + N$ $O + NO_2 \rightarrow NO + O_2$
Озон ( $O_3$ )	$O_2 + O \rightarrow O_3$	$OH + O_3 \rightarrow HO_2 + O_2$ $O_3 + NO \rightarrow NO_2 + O_2$
Хидропероксил радикал ( $HO_2$ )	$OH + H_2O_2 \rightarrow HO_2 + H_2O$ $OH + O_3 \rightarrow HO_2 + O_2$ $H + O_2 \rightarrow HO_2$ $HNO_2 + OH \rightarrow HO_2 + NO_3$	$HO_2 + HO_2 \rightarrow H_2O_2 + O_2$ $OH + HO_2 \rightarrow O_2 + H_2O$ $NO + HO_2 \rightarrow OH + NO_2$
Азот монооксид радикал ( $NO$ )	$N + O \rightarrow NO$ $N + OH \rightarrow NO + H$ $N + O_2 \rightarrow NO + O$ $N + O + M \rightarrow NO + M$ $N + O_3 \rightarrow NO + O_2$ $N + O_2(^1S) \rightarrow NO + O$ $N_2 + O \rightarrow NO + N$ $N_2 + O_3 \rightarrow 2NO + O$ $2HNO_2 \rightarrow NO + NO_2 + H_2O$ $NO_2 + UV \rightarrow NO + O$ $NO_3 + UV \rightarrow NO + O_2$ $ONOO \rightarrow NO + O_2$	$NO + NO \rightarrow N_2 + O_2$ $2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2$ $NO + OH \rightarrow HNO_2$ $NO + HO_2 \rightarrow HNO_3$ $2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2$ $O_3 + NO \rightarrow NO_2 + O_2$
Пероксинитрат ( $ONOO$ )	$O_2 + NO \rightarrow ONOO$ $OH + NO_2 \rightarrow ONOO + H^+$	$ONOO \rightarrow NO + O_2$
Нитрити ( $NO_2$ )	$2NO_2 + H_2O \rightarrow NO_2 + NO_3 + 2H^+$ $2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2$ $2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2$ $O_3 + NO \rightarrow NO_2 + O_2$ $NO + HO_2 \rightarrow OH + NO_2$	$NO_2 + H^+ \rightarrow HNO_2$ $H_2O_2 + H^+ + NO_2 \rightarrow ONOOH + H_2O$ $3NO_2 + 3H^+ \rightarrow 2NO + NO_3 + H_3O^+$ $3NO_2 + H_2O \rightarrow 2HNO_3 + NO$ $NO_2 + NO_3 \rightarrow N_2O_5$
Нитрати ( $NO_3$ )	$HNO_2 + OH \rightarrow NO_2 + H_2O$ $HNO_2 \rightarrow NO_2 + H^+$ $4NO + O_2 + 2H_2O \rightarrow 4NO_2 + 4H^+$ $NO_2 + O \rightarrow NO_3$ $NO_2 + O_3 \rightarrow NO_3 + O_2$ $HNO_3 \rightarrow NO_3 + H^+$ $4NO_2 + O_2 + 2H_2O \rightarrow 4NO_3 + 4H^+$	$OH + NO_2 \rightarrow ONOO + H^+$ $NO_2 + UV \rightarrow NO + O$ $NO_3 + UV \rightarrow NO + O_2$
Азотаста киселина ( $HNO_2$ )	$NO_2 + H^+ \rightarrow HNO_2$ $NO + OH \rightarrow HNO_2$	$HNO_2 + OH \rightarrow HO_2 + NO_3$ $HNO_2 + OH \rightarrow NO_2 + H_2O$ $HNO_2 \rightarrow NO_2 + H^+$ $2HNO_2 \rightarrow NO + NO_2 + H_2O$
Азотна киселина ( $HNO_3$ )	$N_2O_5 + H_2O \rightarrow 2HNO_3$ $3NO_2 + H_2O \rightarrow 2HNO_3 + NO$ $NO_2 + OH \rightarrow HNO_3$ $NO + HO_2 \rightarrow HNO_3$	$HNO_3 \rightarrow NO_3 + H^+$ $HNO_3 \rightarrow NO_2 + OH$

\* представља активно место катализатора

Неравнотежно стање RAW током којег настају реактивне врсте траје докле год се на воду делује нетермалном плазмом. По престанку излагања воде плазми, у RAW се задржавају само хемијски стабилне врсте, док се каткоживеће врсте распадају. У табели 2.6 приказане су дужине полуживота доминантних реактивних врста.

Табела 2.6. Време полуживота одабраних реактивних врста [182,183]

Реактивне врсте	Дужина полуживота	
Реактивне кисеоничне врсте	Водоник пероксид ( $H_2O_2$ )	хемијски стабилан
	Хидроксил радикал ( $\cdot OH$ )	$10^{-9}$ s
	Супероксид ( $O_2^{\cdot -}$ )	$10^{-9}$ s
	Синглетни кисеоник ( $^1O_2$ )	4,4 $\mu$ s
	Озон ( $O_3$ )	око 1 s
	Алкоксил радикали ( $RO\cdot$ )	$10^{-6}$ s
	Пероксил радикали ( $ROO\cdot$ )	7 s
	Хидропероксиди ( $ROOH$ )	и до 2 h
Реактивне азотне врсте	Азот моноксид радикал ( $NO\cdot$ )	око 1 s
	Пероксинитрат ( $ONOO\cdot$ )	$10^{-3}$ s
	Нитрити ( $NO_2^{\cdot -}$ )	хемијски стабилни
	Нитрати ( $NO_3^{\cdot -}$ )	хемијски стабилни
	Јони амонијума ( $NH_4^+$ )	хемијски стабилни
	Азотаста киселина ( $HNO_2$ )	око 1 s

Тип и концентрација реактивних врста које остају присутне у RAW и по завршетку активирања плазмом одређују физичко-хемијска својства RAW. Већина реактивних врста које настају током третмана доводе до снижавања рН вредности RAW, при чему највећи утицај на рН имају јони нитрата и нитрита [184]. Повећањем дужине третмана RAW постаје све киселија. Међутим, након одређеног времена, рН вредност достиже свој минимум и даље продужавање дужине третмана не доприноси додатном закишељавању воде [185]. Минимална вредност рН активираних воде, као и време потребно да се ова вредност достигне зависе од конфигурације плазме, као и од доводног гаса [186]. Настале реактивне врсте утичу и на електричну проводљивост воде, која је у сложеној релацији са рН вредношћу и зависи од присуства растворених соли, јона и сл. При високим рН вредностима у алкалној средини проводљивост је висока услед високе концентрације катјона и анјона база, али и при ниским вредностима рН проводљивост може бити висока услед присутних  $H^+$  јона. Оксидо-редукциони или редокс потенцијал RAW у великој мери зависи од насталих реактивних врста, а пре свега од водоник пероксида. Водоник пероксид може деловати и као оксидационо ( $E^\circ = 1,77$  V) и као редукционо средство ( $E^\circ = -0,7$  V) [187]. Излагањем воде нетермалној плазми расте концентрација присутног водоник пероксида, што доводи до повећања редокс потенцијала настале RAW. Ово својство RAW доприноси њеној ефикасности у нарушавању ћелијске мембране и чини је погодном за примену у инактивацији микроорганизама. Стога се RAW може користити као средство за дезинфекцију и деконтаминацију, нарочито у прехранбеној индустрији, као и за разградњу пестицида [188,189]. Осим тога, RAW се примењује и у пољопривреди. Реактивне азотне врсте присутне у RAW представљају извор азота неопходан у процесу клијања, док реактивне кисеоничне врсте катализују биолошке процесе који се одвијају током клијања. Синергистичким деловањем насталих врста се поспешује клијање семена житарица, воћа и поврћа [190]. Такође, RAW је све заступљенија и у биомедицини, где је доказано њено антитуморно дејство на неколико типова ћелија [179,191]. Хидроксил радикал који настаје применом плазме у течној фази може да реагује са атомом водоника присутног у органским једињењима, која се на овај начин преводе у алкил радикале. Алкил радикали постају веома реактивни и интересују са другим молекулима. Овај механизам разградње органских једињења посредством нетермалне плазме је од посебног значаја у третману отпадних вода, нарочито за разградњу органских боја, лекова и других контаминаната који потичу из фармацеутске индустрије [192,193]. По истом принципу могуће је применити нетермалну плазму и за третман лигноцелулозне биомасе.

### 2.4.3. Третман лигноцелулозне биомасе нетермалном плазмом

Нетермална плазма је релативно нова технологија за третман лигноцелулозне биомасе која је још увек у фази интензивних истраживања и развоја. Предности нетермалне плазме у односу на друге третмане су нетоксичност, једноставност извођења, могућност коришћења RAW богате реактивним врстама уместо реагенаса, одсуство отпадних токова које треба посебно третирати пре одлагања, као и одсуство негативног утицаја на животну средину. Такође, применом овог третмана се смањује могућност настанка инхибиторних једињења, а настале реактивне врсте, заједно са UV зрачењем, могу инактивирати микроорганизме присутне у биомаси [194]. Међутим, у зависности од типа конфигурације плазме која се користи, сам третман може бити енергетски захтеван. Стога се у третмане нетермалном плазмом често уводе катализатори, било хомогени ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) или хетерогени (оксиди метала) у циљу повећања ефикасности третмана [13]. Осим тога, за генерисање плазме се може користити и енергија добијена из обновљивих извора и тиме допринети одрживости третмана.

Механизам разградње лигноцелулозне биомасе применом нетермалне плазме заснива се на кидању водоничних и ковалентних веза којима су повезани целулоза, хемицелулоза и лигнин, посредством реактивних врста. Реактивне врсте које настају током третмана плазмом могу да изазову промене у структури сва три полимера и доводе до разградње лигноцелулозе, у зависности од услова третмана. Промене изазване плазмом зависе од типа реактивних врста, али и од структуре самих полимера. Хидроксил радикал, водоник пероксид и озон имају значајну улогу у делигнификацији. Ове врсте оксидују алифатични део лигнина, уз кидање C-C, C=C и C=O веза које одржавају његову структуру [195]. Додатно, фенолна једињења у лигнину се преводе у радикале, који постају високо реактивни и покрећу реакције деполимеризације. До деполимеризације долази услед кидања  $\beta$ -O-4 арил етарских веза, док фенол прстен и други типови веза остају готово неизмењени [196]. Кидањем  $\beta$ -O-4 веза долази до уклањања ароматичних једињења лигнина, попут кониферил и синапил алкохола [197]. Међутим, присуство већих количина оксидативних врста може имати и негативан утицај на разградњу лигноцелулозе. Када целулоза дође у контакт са оксидативним врстама, пре свега са хидроксил радикалом, долази до раскидања C4-O везе, коју карактерише најнижа енергија дисоцијације ( $229,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Након тога долази до отварања пиранозног прстена [198]. Ове промене доводе до деполимеризације целулозе, што је неповољно са аспекта њене даље валоризације. Нежељена деполимеризација целулозе се може избећи адекватним одабиром доводног гаса за генерисање плазме. Осим доводног гаса, на ефикасност третмана утицај има и конфигурација нетермалне плазме, као и дужина трајања третмана. Такође, неопходно је утврдити и оптималан хидромодул, како би се обезбедио ефикасан пренос масе насталих реактивних врста до свих честица биомасе [199].

Третман нетермалном плазмом се до сада показао као ефикасан на различитим типовима лигноцелулозне масе. Примењеним третманима је дошло до делигнификације и остварени су виши приноси шећера након хидролизе. Већина третмана је вршена у воденом медијуму, а истраживања су била усмерена на проналажење оптималних услова третмана, пре свега у погледу дужине третмана, избора доводног гаса и типа нападања. Поједине студије су потврдиле могућност употребе других медијума, попут етанола или слабих раствора киселина и база. Наведена истраживања представљају добру основу за развијање и унапређење третмана заснованих на примени плазме. У следећој фази требало би испитати интеракцију плазме са различитим реагенсима који се користе у третману биомасе, као и потенцијални синергизам између плазме и постојећих третмана биомасе, што је уједно и предмет истраживања у оквиру ове докторске дисертације. Преглед одабраних третмана лигноцелулозне биомасе нетермалном плазмом приказан је у табели 2.7.

Табела 2.7. Преглед третмана лигноцелулозне биомасе нетермалном плазмом

Биомаса	Процесни услови	Исход третмана	Реф.
Пшенична стабљика	Биомаса је помешана са водом и третирана у DBD реактору од 1 h до 7 h; као доводни гас коришћен ваздух при протоку од 12 slm	Примењеним третманом је уклоњено 20% лигнина, а третирана биомаса је коришћена за производњу етанола, уз остварен принос од 53%	[200]
Пшенична стабљика	Биомаса је помешана са 40% (мас.) етанолом и третирана у DBD реактору од 10 s до 300 s; као доводни гасови коришћени су ваздух, азот и угљеник (IV) оксид	Третманом плазмом у трајању од 90 s, уз употребу ваздуха као доводног гаса, добијено највише шећера након ензимске хидролизе – 358,4 mg g <sup>-1</sup> глукана и 135,8 mg g <sup>-1</sup> ксилана	[201]
Пивски троп	Биомаса је помешана са водом и третирана у DBD реактору од 2,5 min до 60 min; као доводни гасови коришћени су ваздух и смеша ваздуха и аргона	Примењеним третманом уклоњено је од 43% до 50% лигнина и око 32% хемицелулозе, у зависности од услова третмана	[202]
Пивски троп	Биомаса је помешана са водом, киселином или базом, и третирана у DBD реактору 5 min, 10 min и 15 min; као доводни гас коришћен ваздух при протоку од 1 slm	Највише редукујућих шећера (162,9 mg mL <sup>-1</sup> ) је ослобођено третманом биомасе у води, у трајању од 10 min; уклоњено је 36% лигнина; произведено је 25,06 g L <sup>-1</sup> етанола	[12]
Мухар	Биомаса је третирана у плазма реактору са флуидизованим слојем; као доводни гас коришћен је водоник при протоку од 6 slm	Током третмана 4,4% биомасе преведено у CO <sub>2</sub> , 5,9% у CO, 16,9% у CH <sub>4</sub> , 8,2% у C <sub>2</sub> H <sub>x</sub> , 9,6% у C <sub>3</sub> H <sub>x</sub> и 0,2% у C <sub>4</sub> H <sub>x</sub>	[203]
Багаса шећерне трске	Биомаса је помешана са раствором који је садржао NaOH и Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , при различитим рН вредностима, и добијена суспензија је третирана у DBD реактору 2 h; као доводни гас коришћен је ваздух	Највише лигнина (58,5%) је уклоњено при рН 12; након ензимске хидролизе овог узорка остварен је и највиши принос шећера – 51,3% глукозе и 38,5% ксилозе	[204]
Багаса шећерне трске	Биомаса је помешана се дејонизованом водом и третирана у DBD реактору 20 min, кроз четири циклуса третмана од по 5 min; као доводни гас коришћен је ваздух	Третирана биомаса је накнадно подвргнута аутохидролизе и остварен је укупан принос кليسлоолигосахарида од 41,1%	[205]
Кинески шаш	Биомаса је помешана са дејонизованом водом и третирана у DBD реактору од 1 h до 4 h; као доводни гас коришћен ваздух при протоку од ~2 slm	Ензимском хидролизом третиране биомасе остварен принос шећера од 18% до 26%, у зависности од услова третмана	[206]
Отпад из производње кафе	Биомаса је помешана са разблаженом киселином и гвожђе хлоридом, како би се симулирали услови Фентон реакције, а затим третирана у DBD реактору 2, 4 и 6 min; као доводни гас коришћен је ваздух	Ензимском хидролизом третиране биомасе остварен је принос редукујућих шећера од 0,496 g g <sup>-1</sup> , а њеном ферментацијом је произведено 18,64 g L <sup>-1</sup> етанола	[207]

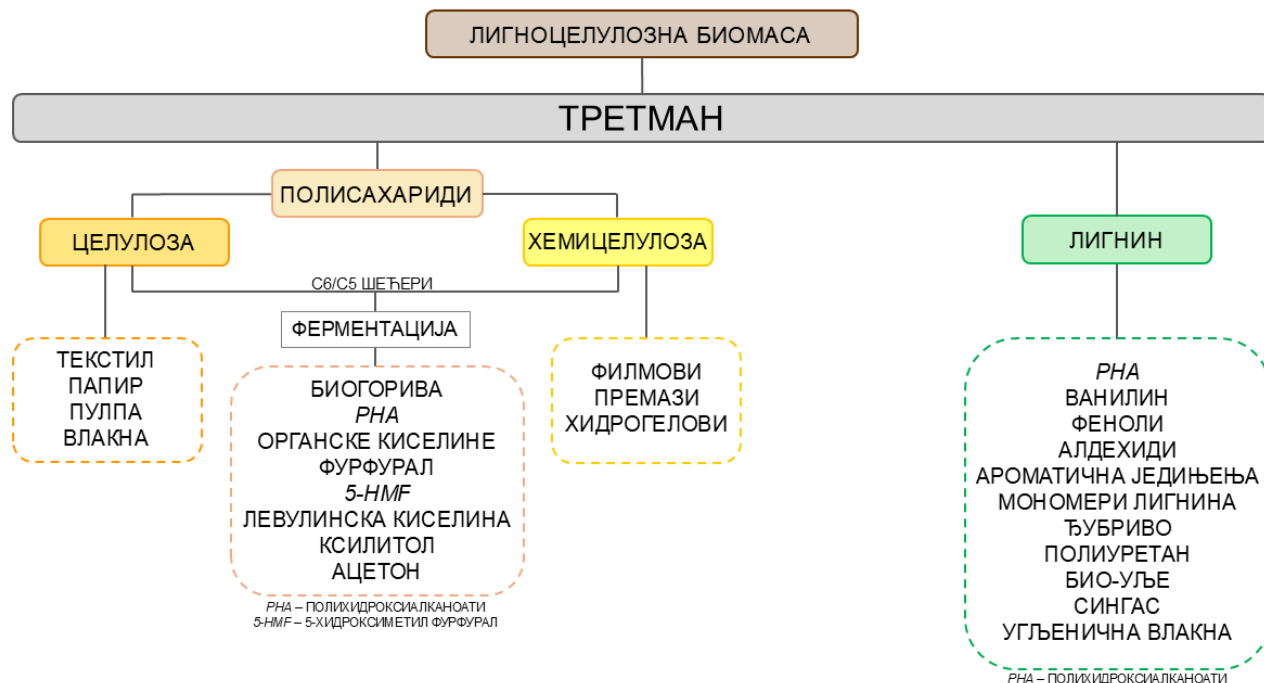
Табела 2.7. Преглед третмана лигноцелулозне биомасе нетермалном плазмом (наставак)

Биомаса	Процесни услови	Исход третмана	Реф.
Кукурузна стабљика	Пре третмана биомасе, DBD комора је кратко загрејана на 60 °C до 100 °C; сува биомаса је третирана у комори, а као доводни гас је коришћен азот, протока од 0,03 slm до 1,5 slm	На температури од 150 °C степен конверзије биомасе до моно- и дисахарида је након 2 h износио 79,6%, док је на собној температури био упола нижи (40,6%)	[208]
Љуска семена манга, кора банане и пивски троп	Сва три типа биомасе су појединачно третирана; биомаса је помешана са водом, а затим третирана у плазма реактору 5 min; као доводни гас коришћен је ваздух	Највећи степен делигнификације (48%) постигнут је третманом пивског тропа, док је из љуске семена манга уклоњено 35% лигнина, а из коре банане 24% лигнина	[209]
Борова пиљевина, кукурузни окласак и пиринчана стабљика	Сва три типа биомасе су појединачно третирана; биомаса је помешана са растварачем који се састојао из глицерола и PEG 200, уз сумпорну киселину као катализатор и третирана је при различитим дужинама третмана	Ликвефакцијом сва три типа биомасе произведено је око тридесет различитих производа; највећи принос ликвефакције (97,5%) остварен је са кукурузним окласком, док је течено гориво са највишом грејном вредношћу добијено ликвефакцијом пиљевине	[210]
Кукурузовина, пшенична и пиринчана стабљика	Сва три типа биомасе су појединачно третирана; биомаса је помешана са водом, киселим или базним пуфером и третирана у DBD реактору 1 h и 3 h; као доводни гас коришћен ваздух при протоку од ~5 slm	Третирана биомаса је подвргнута анаеробној дигестији, при чему је највећи принос биометана остварен дигестијом кукурузовине у рН неутралној средини и при краћој дужини третмана	[211]

DBD – диелектрично баријерно пражњење; slm – стандардни литар по минути; PEG 200 – полиетилен-гликол 200

## 2.5. Валоризација лигноцелулозне биомасе

Применом одабраног третмана лигноцелулозна биомаса се фракционише до својих основних компоненти – целулозе, хемицелулозе и лигнина. У зависности од ефикасности примењеног третмана добијају се фракције већег или мањег степена пречишћености, који утиче и на састав фракције, односно на начин њеног искоришћења. Неки од начина валоризације лигноцелулозне биомасе у биорафинеријским поступцима приказани су на слици 2.15.



Слика 2.15. Валоризација лигноцелулозне биомасе у биорафинеријским поступцима

Целулоза изолована из лигноцелулозне биомасе представља добар извор глукозе – ферментабилног моносахарида погодног за микробиолошке трансформације у биорафинеријским процесима. Стога се целулоза добијена након третмана неретко подвргава ензимској хидролизи у циљу даље деполимеризације. Добијени хидролизати се затим користе као ферментациони медијуми за производњу биоетанола [212], биоводоника [213], а нешто ређе и биодизела [214] као и низа других хемијских једињења - платформских хемикалија, као што су органске киселине, прекурсори, полупроизводи и други готови производи. Детаљнији опис истакнутих стратегија за искоришћење угљено-хидратних компонента лигноцелулозне биомасе посебно важних за ову дисертацију су дати у одељцима 2.5.1., 2.5.2. и 2.5.3. Полупроизводи и готови производи који се могу добити из лигноцелулозне биомасе су приказани у табели 2.8. Изолована целулоза се може користити и директно, као супстрат у производњи биогаса применом анаеробне дигестије [215]. Такође, широку примену има и у текстилној и папирној индустрији. Као микрокристална целулоза се може користити у фармацеутској и прехранбеној индустрији, док наноцелулозна влакна представљају материјал за паковања побољшаних карактеристика [216].

Ензимском хидролизом хемицелулозе добија се смеша пентоза и хексоза које се могу користити као извори угљеника у ферментационим процесима. Као и у случају целулозе, ферментацијом хидролизата могу се произвести биогорива. Ипак, најзначајнији производи који настају деполимеризацијом хемицелулозе су фурфурал и 5-хидроксиметил фурфурал. Фурфурал може послужити као алтернативна сировина за производњу фурфурил алкохола и тетрахидрофурфурил алкохола, уместо конвенционално коришћених фосилних сировина [217]. Из фурфурала даље настају левулинска киселина и 5-хидроксиметил фурфурал, који представљају важне прекурсоре за производњу биогорива, фармацеутика и бројних реагенаса које се уобичајено добијају петрохемијским путем [217,218]. У зависности од порекла,

хемицелулоза је доминантно изграђена од глукана или од ксилана. Захваљујући својим физичко-хемијским својствима, ови полисахариди се могу користити у прехранбеној и фармацеутској индустрији, али и у производњи биофилмова и хидрогелова [219,220]. Такође, деривати ксилана и глукана имају доказано пребиотско дејство, те су све чешће заступљени у функционалним прехранбеним производима [221].

Лигнин карактерише комплексан хетерогени састав, а тиме и бројне могућности за његову валоризацију. Ароматична полифенолна једињења лигнина, која представљају алтернативу за фенол добијен петрохемијским путем, могу се превести у био-уља и биочађ [222]. Ова једињења улазе и у састав биоразградивих биополимера, попут полихидроксиалканоата и полихидроксибутирата, али и полиола и смола на бази фенола. Демонстрацијом лигнина до фенола и њиховом даљом трансформацијом настају алкани који се могу применити као алтернативно течном авио-гориво [223]. Осим алкана, лигнин се може превести у арене, који су значајна компонента течних биогорива [224]. Наночестице лигнина имају важну улогу у формулацији функционалних материјала, који су биокompatibilни и биоразградиви [27]. Ове честице дају чврстоћу и стабилност материјалима за паковање, а захваљујући биолошкој активности могу продужавати рок трајања свежих намирница. Способност лигнина да апсорбује UV зраке обезбеђује и фотостабилност [225]. Осим тога, хидрогелови на бази лигнина имају антиоксидативна и антимицробна својства, што их чини посебно погодним за примену у биомедицини [226]. Висок садржај угљеника омогућава преводње лигнина у угљенична нановлакна и графен, који служе као складишта енергије у производњи батерија и суперкондензатора [227]. Мономери лигнина се могу користити за синтезу реагенса, попут гвајакола и различитих алдехида [228]. Такође, лигнин представља важну сировину за производњу ванилина природног порекла [229]. Одабрани полупроизводи и готови производи који се могу добити из лигноцелулозне биомасе приказани су у табели 2.8.

### 2.5.1. Производња млечне киселине

Млечна киселина (2-хидроксипропионска киселина) је природна органска киселина која има велики биотехнолошки значај. Захваљујући свом GRAS (енгл. *Generally Recognized As Safe*) статусу, потпуно је безбедна и погодна за употребу у различитим гранама индустрије – прехранбеној, козметичкој, фармацеутској, хемијској и текстилној, али и у медицини. У прехранбеној индустрији се користи као појачивач укуса, конзерванс, ацидулант, регулатор рН вредности, а посебно је важна у производњи ферментисаних млечних производа [230]. У козметичким препаратима се користи као средство за хидратацију, хумектанс и као средство за избељивање коже, те је састојак препарата за третман акни и препарата против старења. Важну улогу има у фармацеутској индустрији, као састојак раствора за дијализу и интравенозних раствора, али и за контролисано отпуштање лекова [231]. Осим тога, млечна киселина представља градивну јединицу за добијање поли-млечне киселине – биодеградабилног и биокompatibilног полимера који се може користити као материјал за паковања и градити различите облике влакана и пена погодних и за медицинске намене. Такође, од млечне киселине се могу произвести и ацеталдехид, пропилен гликол, пропионска киселина, етил лактат и акрилна киселина [232].

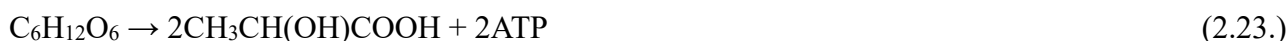
Табела 2.8. Полупроизводи и готови производи добијени из лигноцелулозне биомасе и њихова примена [22,233]

Број С атома	Једињење	Хемијска формула	Примена
1	Метанол	$CH_3OH$	Растварач; супстрат или интермедијар у реакцијама хемијске синтезе
	Метан	$CH_4$	Гориво; супстрат у реакцијама хемијске синтезе
	Синтетички гас	$CO, H_2O, CO_2, H_2$	Гориво; производња електричне енергије; супстрат у реакцијама хемијске синтезе
2	Етилен	$CH_2=CH_2$	Адхезив и везивно средство; мономер за полимеризацију лубриканата и пластике
	Етанол	$C_2H_5OH$	Растварач; састојак хране и напитака
	Етилен-гликол	$CH_2OHCH_2OH$	Растварач у бојама и пластици; антифриз у системима за грејање и хлађење; хидраулични флуид у кочницама
	Гликолна киселина	$HOCH_2CO_2H$	Средство за појачавање укуса; конзерванс у фармацеутској и козметичкој индустрији, бојама и средствима за потамњивање у текстилној индустрији
	Сирћетна киселина	$CH_3COOH$	Супстрат у хемијским и аналитичким реакцијама; корозивна хемикалија; средство за бојење тканина и потамњивање коже (материјала)
3	Млечна киселина	$CH_3CH(OH)COOH$	Адхезив; средство за пластифицирање; адитив у фармацеутској индустрији
	Акрилна киселина	$CH_2=CHCOOH$	Мономер пластике; адитив у бојама, кожи (материјалу), папирним превлакама, детергентима, флуидима за аутомобиле, специјалним мастилима и адхезивима; састојак пелена за једнократну употребу; примена у медицини као ортопедски цемент и у стоматологији као вештачки зуб
	Глицерол	$C_3H_8O_3$	Растварач; супстрат и интермедијар у реакцијама хемијске синтезе; састојак сапуна, детергената и естара глицерола
	3-хидрокси-пропионска киселина	$C_3H_6O_3$	Мономер и супстрат за производњу биодеградабилне пластике
	Пропилен	$C_3H_6$	Мономер и супстрат за производњу биодеградабилне пластике; супстрат у хемијским реакцијама
	1,3-пропандиол	$C_3H_8O_2$	Растварач; интермедијар и растварач у реакцијама хемијске синтезе
	Пропанол	$C_3H_8O$	Растварач; интермедијар у реакцијама хемијске синтезе у производњи адхезива; везивно средство у производима за пољопривреду
	Етил-лактат	$C_5H_{10}O_3$	Растварач у фармацеутској индустрији; адитив у прехранбеној индустрији; носилац мириса; растварач у производњи нитроцелулозе и целулозних мембрана
	Изопропанол	$C_3H_8O$	Растварач у средствима за чишћење; састојак антисептика и средстава за дезинфекцију
	Пропилен-гликол	$CH_3CH(OH)CH_2OH$	Средство за повећање запремине у фармацеутској индустрији; хемијска сировина за производњу полиестарских смола; супстрат за производњу полиуретана

Табела 2.8. Полупроизводи и готови производи добијени из лигноцелулозне биомасе и њихова примена (наставак)

Број С атома	Једињење	Хемијска формула	Примена
4	Бутанол	$C_4H_{10}O$	Гориво; растварач у хемијској и текстилној индустрији; растварач у хидрауличним и кочионим флуидима
	1,4-бутандиол	$C_4H_{10}O_2$	Растварач у производњи пластике и фармацеутика; супстрат за производњу полимерних влакана
	Сукцинска киселина	$(CH_2)_2(CO_2H)_2$	Прекурсор за производњу биодеградабилних полимера и смола; адитив у прехранбеним производима и дијететским суплементима; средство за појачавање укуса у прехранбеним производима и фармацеутицима
	Етил-ацетат	$CH_3COOC_2H_5$	Адитив у средствима за стврдњавање у бојама, лаковима и пластици
5	Фурфурал	$C_4H_3OCHO$	Хемијска сировина; растварач; адјуванс у хербицидима; састојак смола у полимерним матрицама
	Итаконска киселина	$C_5H_6O_4$	Градивна јединица за производњу биополимера коришћених у грађевини и инфраструктури (нпр. изолација, плочице, подови), у паковањима хране и санитарним производима
	Ксилитол	$C_5H_{12}O_5$	Заслађивач; адитив и средство за згушњавање у фармацеутским производима, дијететским суплементима, пастама за зубе, кондиторским производима и жвакаћим гумама
	Изопрен	$C_3H_8$	Мономер за производњу средстава за чишћење и негу аутомобила (прање, воскирање, подмазивање кочница); природна гума
	Глутаминска киселина	$C_3H_9NO_4$	Дијететски суплемент; средство за појачавање укуса у прехранбеним производима; адитив у прехранбеним производима, пестицидима и лековима
	Левулинска киселина	$CH_3C(O)CH_2CH_2CO_2H$	Прекурсор биогорива, фармацеутика, пластификатора и градивних јединица за производњу других хемикалија
6	Сорбитол	$C_6H_{14}O_6$	Заслађивач; средство за згушњавање; компонента козметичких производа и механичких желатинозних капсула; лаксативно средство
	Адипинска киселина	$HOOC(CH_2)_4COOH$	Прекурсор најлона и полиуретана; средство за пластифицирање PVC-а
	Лизин	$C_6H_{14}N_2O_2$	Дијететски суплемент; адитив у прехранбеним производима
	Лимунска киселина	$C_6H_8O_7$	Дијететски суплемент; појачивач укуса прехранбених производа; регулатор киселости прехранбених и козметичких производа
	Капролактан	$C_6H_{11}NO$	Супстрат за производњу синтетичких влакана, најлона, вештачке коже, пластике и полиуретана
26	Рамнолипиди	$C_{26}H_{48}O_9$	Биосурфанктанти у прехранбеној, козметичкој, фармацеутској индустрији и пољопривреди

Млечна киселина се може добити хемијским или микробиолошким путем. Хемијска синтеза се заснива на употреби петрохемијских сировина које се најпре преводе у ацеталдехид, који се у присуству водоник цијанида преводи до лактонитрила, чијом хидролизом настаје млечна киселина [234]. Као производ хемијске синтезе настаје рацемска смеша D (+) и L (-) изомера млечне киселине, који се могу раздвојити применом додатних сепарационих техника. Међутим, укључивање додатних корака сепарације производа је економски неповољно. Осим тога, употреба петрохемијских сировина није еколошки прихватљива. Наведени недостаци хемијске синтезе млечне киселине се могу превазићи применом микробне синтезе, односно млечно-киселинске ферментације. На овај начин производи се преко 90% млечне киселине [235]. Млечно-киселинска ферментација се изводи на знатно нижим температурама од хемијске синтезе, захтева улагање мање количине енергије, а могућност употребе обновљивих сировина доприноси одрживости овог поступка [236]. Млечно-киселинском ферментацијом настају оптички чисти изомери млечне киселине, те додатни сепарациони кораци нису потребни. Овај процес се заснива на превођењу простих шећера до млечне киселине, при чему се као извори шећера користе до сада најчешће скробне сировине, а ређе различити облици лигноцелулозне биомасе, као и индустријски отпадни токови. У зависности од типа сировине, најпре се примењује одговарајући третман за изоловање угљено-хидратне фракције или њено делимично одвајање од лигнина. Изолована фракција се преводи у прсте, ферментабилне шећере ензимском хидролизом. У ову сврху се најчешће користе ензимски коктели, који представљају смешу целулаза и хемицелулаза, како би се обезбедила хидролиза и целулозе и хемицелулозе [237]. Након сахарификације добија се хидролизат богат хексозама и пентозама, који се подвргава ферментацији применом одабраног соја из групе бактерија млечне киселине (*Lactobacillus sp.*) или ређе применом филаментозних гљива, попут *Rhizopus oryzae* и *Rhizopus arrhizus*. Хомоферментативни сојеви бактерија млечне киселине, попут *Lactobacillus acidophilus*, *Amylolactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Ligilactobacillus salivarius* и *Lacticaseibacillus rhamnosus*, гликолизом преводе глукозу до млечне киселине, која је крајњи производ метаболизма ових сојева [231]. Применом хомоферментативних сојева из једног мола глукозе настају два мола млечне киселине, према једначини 2.23, а максималан теоријски принос износи један килограм млечне киселине по килограму глукозе [231].



Међутим, уколико су изложене стресу, услед ниске рН, ниске температуре или недовољне количине извора угљеника, може доћи до измене доминантног биосинтетског поступка и бактерије могу произвести и мрављу киселину [238]. Са друге стране, хетероферментативни сојеви (*Companilactobacillus alimentarius*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactiplantibacillus pentosus* и *Lactococcus lactis*) поред једног мола млечне киселине производе и по један мол угљеник (IV) оксида и етанола или сирћетне киселине, према једначинама:



У овом случају теоријски принос млечне киселине износи 0,5 килограма по килограму глукозе [231]. Без обзира на тип микроорганизма који се користи, млечно-киселинска ферментација се изводи на температурама у опсегу од 37 °C до 43 °C и при рН од 5 до 7 [239]. Поред поступака са дивљим сојевима који природно производе млечну киселину, могуће је развити поступке и са инжењеризованим сојевима *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.* и *Saccharomyces cerevisiae* [240,241]. Сахарификација и ферментација се могу одвијати као два засебна процеса, или се могу одвијати истовремено, као симултана сахарификација и ферментација. Иако је симултани приступ ефикаснији, различити услови при којима се ови процеси одигравају отежавају њихову контролу. У производњи млечне киселине се могу користити и други приступи, као што су симултана сахарификација и коферментација или одвојена сахарификација и коферментација, али су они заступљенији у другим типовима ферментације

(нпр. алкохолна ферментација). Након ферментације следи издвајање и пречишћавање млечне киселине из ферментационог медијума. Овај корак је најзахтевнији и најскупљи у целокупном процесу производње млечне киселине. Од 40% до 70% укупних капиталних и оперативних трошкова потиче од овог корака [242]. Степен пречишћености млечне киселине зависи од њене даље примене. У прехранбеној индустрији се користи млечна киселина степена чистоће између 80% и 90%, док је за потребе фармацеутске индустрије неопходно остварити степен чистоће преко 90% [237]. Стога се за пречишћавање бирају ефикасне технике, попут различитих типова мембранских сепарација, електродијализе, адсорпције, преципитације и реактивне екстракције. Међутим, како свака од поменутих техника има и одређене недостатке, неопходно је оптимизовати издвајање и пречишћавање млечне киселине у складу са потребама процеса.

### 2.5.2. Производња биоетанола

Биоетанол је течна биогориво високог квалитета које се користи за транспорт. Са уделом од око 70% представља најзаступљеније биогориво [243]. Октански број биоетанола износи 108, што га чини одговарајућим за употребу у моторима са унутрашњим сагоревањем [244]. Садржај енергије биоетанола је мањи од садржаја енергије бензина за 68%. Висок садржај кисеоника у биоетанолу доводи до редуције емисије угљеник (IV) оксида за 80% током његовог сагоревања [245]. Међутим, због нижег садржаја енергије, биоетанол се не користи самостално, већ се умешава са бензином у различитим односима, у складу са ASTM D4806 стандардом [245]. Осим горива за транспортна возила, биоетанол има значајну примену и као растварач, дезинфекционо средство, али и као индустријска сировина.

Биоетанол настаје у процесу алкохолне ферментације и за разлику од етанола, у његовој производњи се не користе петрохемијске сировине. Као супстрат за производњу биоетанола користе се сировине богате угљеним хидратима који се могу хидролизовати до ферментабилних шећера. У ове сировине спадају шећерни и скробни усеви, попут житарица и шећерне трске, (биоетанол прве генерације), затим лигноцелулозна биомаса (биоетанол друге генерације), као и микроалге (биоетанол треће генерације) [116]. Ферментацијом генетски модификованих усева гајених на земљишту које није погодно за гајење хране применом генетски модификованих микроорганизама добија се биоетанол четврте генерације. Међутим, овакав начин производње је још увек у фази испитивања, а очекује се да ће примена биоетанола четврте генерације значајно смањити емисије GHG [246]. Иако представља најзаступљенији биорафинеријски поступак, производња биоетанола прве генерације је у директној конкуренцији са производњом хране, што је чини недовољно одрживом. Са друге стране, употреба микроалги у производњи биоетанола је економски неповољна због високих капиталних трошкова [247]. Стога лигноцелулозна биомаса представља најпогоднију сировину за производњу биоетанола. Међутим, због њене комплексне структуре, третман лигноцелулозне биомасе је неопходан корак који претходи њеној валоризацији кроз алкохолну ферментацију.

Производња биоетанола из лигноцелулозне биомасе је сложен процес који се састоји из неколико корака. Након примењеног третмана и уклањања лигнина, врши се детоксикација третиране биомасе, како би се уклонили потенцијални инхибитори хидролизе или ферментације који могу настати током третмана. Техника којом се инхибиторна једињења уклањају зависи од типа третмана који је коришћен, а најчешће се примењују мембранска екстракција, екстракција растварачима, јонска размена и адсорпција [248]. Затим се третирана биомаса хидролизом преводи у ферментабилне шећере у процесу сахарификације. За хидролизу се углавном бирају ензимски коктели, како би се истовремено омогућила деполимеризација целулозе до глукозе и хемицелулозе до смеше пентоза и хексоза. Осим ензима, у смешу која се подвргава хидролизи се могу додавати и различити адитиви, попут сурфактаната, полимера на бази полиетилен гликола или некаталитичких протеина. Њихова основна улога је спречавање интеракције ензима са резидуалним лигнином присутним у третираној биомаси, чиме се повећава принос шећера у хидролизату [249]. Добијени

хидролизат се затим инокулише одговарајућом културом, чиме започиње алкохолна ферментација. Хексозе и пентозе присутне у хидролизату се преводе у биоетанол према следећим једначинама:



Максималан принос биоетанола који се може добити из једног килограма шећера износи 0,51 килограм [250]. Ферментацију глукозе врше *Zygomonas mobilis* и *S. cerevisiae*, који су погодни за употребу на индустријском нивоу због резистенције на висок садржај етанола, док истовремено обезбеђују високе приносе. Међутим, поменути сојеви не могу да ферментишу пентозе, те се за њихово превођење до биоетанола користе квасци попут *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* и *Pichia stipitis* (позната и као *Scheffersomyces stipitis*) [116]. Ови сојеви су изузетно осетљиви на садржај етанола, низак рН, као и присуство глукозе, што их чини непогодним за примену у индустрији. Стога се ферментација врши поменутим индустријским сојевима, применом генетски модификованих микроорганизама (*S. cerevisiae*, *Zygomonas mobilis*, *E. coli*, *Fusarium oxysporum*) или применом имобилисаних рекомбинантних сојева [251,252]. Као и у случају млечно-киселинске ферментације, сахарификација и ферментација се могу одвијати као два одвојена корака, што је неповољно са енергетског и економског аспекта. Стога се чешће одвијају истовремено, као симултана сахарификација и ферментација, чиме се остварују највиши приноси у једноставнијем систему него у случају одвојених процеса [253]. За максимално искоришћење супстрата се може применити симултана сахарификација и коферментација. Овај приступ подразумева употребу сојева који ферментишу пентозе уз сојеве који ферментишу хексозе, али се због метаболизма примењених сојева добијају нижи приноси биоетанола [254]. Консолидовани процес се заснива на употреби једног или више микроорганизама који имају способност да синтетишу ензиме за хидролизу биомасе, а затим и да добијене шећере преведу у биоетанол. Међутим, овај начин добијања биоетанола није заступљен због дужине трајања процеса (3 до 12 дана), као и због ниских приноса [255]. По завршетку ферментације се врши издвајање биоетанола из ферментационог медијума. Различитим врстама дестилације или мембранском сепарацијом се добија биоетанол који садржи велику количину воде, те се поступком ректификације врши уконцентрисавање до 95%. Апсолутни биоетанол (минимум 99,5%) се може добити дехидратацијом [251].

### 2.5.3. Производња биометана

Биометан представља најзначајније гасовито биогориво које се користи за транспорт. Иако удео биометана у заступљеним биогоривима износи само 3%, употребом биометана уместо фосилних горива би емисије GHG могле да се смање за 80% [256]. Осим горива за транспортна возила, биометан може бити алтернатива природном гасу који се користи у индустрији као енергент, за ликвефакцију и компресију [256]. Овај угљенично-неутрални гас се добија пречишћавањем биогаса насталог у процесу анаеробне дигестије или гасификацијом биомасе и накнадним метановањем. Гасификација биомасе изводи се на 700 °C до 800 °C, на високом притиску и при анаеробним условима, док се анаеробна дигестија изводи на температурама до 60 °C. Стога је анаеробна дигестија заступљенији процес, током којег се производи око 90% укупно произведеног биометана [243].

Анаеробна дигестија је биохемијски процес у коме се комплексна органска једињења преводе у биогас. Овај процес се користи у постројењима за третман отпадних вода, док се природно одвија у дубљим слојевима депонија. Међутим, тренутно се највећа количина биогаса, око 70%, производи дигестијом енергетских усева [242]. Како лигноцелулоза по својој структури представља одговарајући супстрат захваљујући високом садржају шећера, пољопривредни остаци се такође могу укључити у процес анаеробне дигестије. Превођење лигноцелулозе у биогас врши микробиолошки конзорцијум који се састоји из факултативних и облигатно анаеробних врста [257]. Сам процес се одвија кроз четири фазе – хидролизу, ацидогенезу, ацетогенезу и метаногенезу. Током хидролизе, анаеробне и факултативно

анаеробне бактерије производе екстрацелуларне хидролазе којима се лигноцелулоза деполимеризује [258]. Настали мономери се у процесу ацидогенезе разграђују до испарљивих органских киселина краћих ланаца (53% до 58% сирћетне киселине, 6% до 13% пропионске киселине и 30% до 35% бутерне киселине), уз мање количине алкохола, алдехида, водоника и угљеник (IV) оксида [259]. Овај корак врше ацидогене факултативно аеробне бактерије. Добијене испарљиве масне киселине и алкохоли се у процесу ацетогенезе преводе у ацетат, угљеник (IV) оксид и водоник посредством синтрофних бактерија. Неки од родова који врше поменуте трансформације су *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Staphylococcus* и *Escherichia* [260]. Након ацетогенезе, метаногене бактерије из родова *Methanosarcina* и *Methanothrix* преводе ацетат у метан и угљеник (IV) оксида, док се водоник оксидује помоћу сојева из родова *Methanococcus*, *Methanobacterium* и *Methanobacillus* [261,262]. Иако ацетогенеза представља енергетски неповољан процес, она се природно одиграва током анаеробне дигестије заједничком активношћу ацетогених и метаногених бактерија [263]. Све остале фазе процеса су енергетски повољне. Општи механизам одвијања анаеробне дигестије приказан је у табели 2.9.

Табела 2.9. Механизам одвијања анаеробне дигестије [263]

Фаза процеса		$\Delta G^\circ$ (kJ по реакцији)*
Ацидогенеза	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2CO_2 + 2H^+ + 4H_2$	- 206
	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$	- 358
	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COO^- + 2CO_2 + H^+ + 2H_2$	- 255
Ацетогенеза	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	+ 76,0
	$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+ 48,1
	$CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+ 9,60
Метаногенеза	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^- + 2H_2$	- 31,0
	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 5,3H_2O$	- 33,9
	$4HCOO^- + H_2O + H^+ \rightarrow CH_4 + 3HCO_3^-$	- 32,6

\*Гибсова слободна енергија при стандардним условима

Као производ анаеробне дигестије добија се биогаз, чији састав зависи од типа супстрата и услова при којима се процес одвија, а креће се у опсегу од 50% до 75% метана и од 25% до 45% угљеник (IV) оксида, док су амонијак, водоник и водоник сулфид присутни у траговима [256]. У зависности од типа супстрата, анаеробна дигестија се може одвијати у чврстом и у течном стању. Анаеробна дигестија у чврстом стању се примењује код супстрата чији садржај чврсте материје премашује 15%, као што је случај са пољопривредним остацима [258]. На ефикасност процеса утичу бројни фактори, попут температуре, рН вредности, алкалинитета, времена задржавања, садржаја азота и односа угљеника и азота. Анаеробна дигестија се изводи у неком од три температурна опсега – психрофилном (од 10 °C до 20 °C), мезофилном (од 30 °C до 40 °C) или термофилном (од 56 °C до 60 °C), који се одређује на основу сојева који врше дигестију [264]. Одабрани сојеви утичу и на рН вредност процеса, која најчешће износи око 7, док њена вредност може благо опадати у различитим фазама процеса, у зависности од насталих производа, попут испарљивих масних киселина [265]. Садржај угљеника, азота, фосфора и сумпора у супстрату има кључну улогу када је реч о макронутријентима, са оптималним односом азота и угљеника од 1:20 до 1:30 [264]. Када се као супстрат користи лигноцелуозна биомаса, брзина деполимеризације је често ограничавајући фактор, чинећи хидролизу најспоријом фазом читавог процеса [266]. Стога се најпре врши делимична разградња лигноцелулозе применом третмана, како би се повећала ефикасност процеса кроз смањење дужине трајања и повећање приноса.

#### 2.5.4. Валоризација кукурузне стабљике

Захваљујући свом саставу који укључује висок садржај угљених хидрата, кукурузна стабљика се може користити за производњу биогорива, попут биоетанола [212]. Осим тога, може бити полазна сировина за добијање градивних јединица које се користе за добијање реагенаса, као што су дикарбоксилне киселине, пропионска, млечна, леулинска, сукцинска и јабучна киселина, затим ксилитол, фурфурал, 5-хидроксиметил фурфурал, 5-хлорметил фурфурал, 1,4-пентадиол, разне врсте ензима, биосурфактаната и биосорбената, док се од лигнина могу добити биоактивна једињења која поседују антиоксидативну и антимицробну активност [47]. У оквиру ове дисертације су разматране валоризације третиране кукурузне стабљике у биотехнолошким процесима производње млечне киселине, биоетанола и биометана. У табели 2.10 је дат преглед досадашњих резултата у студијама других аутора на истом супстрату, са посебним освртом на постигнуте приносе и концентрација производа у зависности од примењеног третмана. Значајан број испитиваних поступака користи киселине у третманима и често није вршено фракционисање већ су поступци били усмерени на коришћење само једне фракције лигноцелулозне биомасе. Такође, плазма третман лигноцелулозне биомасе је разматран до сада у једној студији, али без додатака реагенаса, за примену у производњи биогаса. Остале студије су испитивале биотехнолошке валоризације које нису разматране експериментално у оквиру ове дисертације, али могу бити важне за дизајнирање нових поступака у будућности. Посебно за нове стратегије искоришћења фракција добијених комбинованим плазма третманима развијеним у оквиру дисертације.

Табела 2.10. Преглед најзначајнијих третмана кукурузне стабљике и њене валоризације

Третман	Процесни услови	Добијени производ(и)	Реф.
Алкални третман	Стабљика је третирана 2% (мас.) раствором NaOH у високопритисном реактору током 1 h на 120 °C	Ферментацијом хидролизата третиране биомасе добијено 129,4 g L <sup>-1</sup> , односно 0,92 g g <sup>-1</sup> L-млечне киселине	[267]
Биолошки третман	Стабљика је третирана микробним конзорцијумом ( <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Limosilactobacillus fermentum</i> и <i>Enterococcus durans</i> ), током 28 дана на 30 °C	Ферментацијом хидролизата третиране биомасе добијено 18,5 g L <sup>-1</sup> , односно 0,31 g g <sup>-1</sup> L-млечне киселине	[268]
Третман јонским течностима	Стабљика је третирана смешом холин хлорида и глицина у односу 1:1,05, на 90 °C, при различитим дужинама трајања третмана (0,5 h до 8 h)	Дигестибилност целулозе након примењеног третмана износила је 99,23%, а њеном хидролизом је произведено 0,96 g g <sup>-1</sup> млечне киселине	[269]
Третман чврстом киселином	Стабљика је третирана чврстом хлороводоничном киселином (смеша сулфаминске киселине, натријум хлорида и металних оксида) на различитим температурама и при различитим дужинама трајања третмана	Ферментацијом хидролизата третиране стабљике током 48 h остварен је принос од 18 g L <sup>-1</sup> D-млечне киселине	[270]
Третман разблаженом киселином	Стабљика је третирана 2% (мас.) раствором сумпорне киселине у аутоклаву, на 121 °C, током 90 min	Ферментацијом хидролизата третиране биомасе произведено је 70,7 g L <sup>-1</sup> D-млечне киселине	[271]
Алкални третман	Стабљика је третирана 2% (мас.) раствором NaOH током 1,33 h на 118 °C	Хибридном ферментацијом хидролизата третиране стабљике је произведено 50,3 g L <sup>-1</sup> етанола и 24,25 g L <sup>-1</sup> L-млечне киселине	[272]
Третман разблаженом киселином	Стабљика је третирана сумпорном киселином различитих концентрација, у аутоклаву, на 121 °C, при различитим дужинама третмана	Ферментацијом хидролизата третиране биомасе остварен принос етанола од 0,21 g g <sup>-1</sup>	[273]
Третман киселином	Стабљика је помешана са азотном киселином и третирана у реактору током 1 min до 10 min и у температурном опсегу од 120 °C до 160 °C	Ферментацијом хидролизата стабљике третиране при оптималним условима остварен принос од 22,4 g L <sup>-1</sup> етанола и 1,04 g L <sup>-1</sup> липида за производњу биодизела	[274]
DES третман	Стабљика је третирана еутектичком смешом сачињеном од холин хлорида и различитих HBD, током 6 h на 120 °C	Највећи принос етанола од 54,86% остварен након третмана еутектичком смешом која је садржала холин хлорид и глицерол	[275]

Табела 2.10. Преглед најзначајнијих третмана кукурузне стабљике и њене валоризације (наставак)

Третман	Процесни услови	Добијени производ(и)	Реф.
Кисело-алкални третман	Стабљика је третирана разблаженом киселином и алкалним раствором натријум-сулфита на 140 °C и 150 °C, уз варирање концентрације киселине (0,8%, 1,0% и 1,2% (мас.))	При оптималним условима третмана остварен принос етанола од 48,5 g L <sup>-1</sup>	[276]
Биолошки третман	Стабљика је инокулисана базидиомицетом <i>I. lacteus</i> и инкубирана 21 дан на 30 °C	Након 94-часовне симултане сахарификације и ферментације остварен је принос етанола од 13,5 g L <sup>-1</sup>	[277]
Алкални третман	Стабљика је третирана 2% (мас.) алкалним раствором водоник пероксида током 24 h на 35 °C	Након дигестије је произведено 256 mL g <sup>-1</sup> VS биометана	[278]
DES третман	Стабљика је третирана алкалном еутектичком смешом, сачињеном од етилен-гликола, натријум-хидроксида и урее, уз варирање процесних параметара	При оптималним условима третмана, максимални принос биометана износио је 673,6 mL g <sup>-1</sup> VS	[279]
Биолошки третман	Стабљика је третирана сировим ензимима изолованим из <i>Trichoderma viride</i> и <i>Aspergillus sp.</i> , током 6 дана на 50 °C	Након дигестије је остварен принос биометана од 512,6 mL g <sup>-1</sup> VS	[280]
Експлозија воденом паром	Стабљика је изложена воденој пари на температури од 140 °C до 220 °C, од 2 min до 15 min	Најбољи резултати остварени су применом третмана на 160 °C у трајању од 2 min, при чему је произведено 585 mL g <sup>-1</sup> VS	[281]
Третман нетермалном плазмом	Стабљика је помешана са чесменском водом и третирана у DBD плазма реактору 2 h, уз употребу ваздуха као напојног гаса	Након 35-дневне дигестије је остварен принос биометана од 213,35 mL g <sup>-1</sup> VS	[282]
Ултразвук/DES/третман органским растварачем	Стабљика је помешана са еутектичком смешом сачињеном од холин хлорида и различитих HBD, или са диметил-сулфоксидом, а затим подвргнута ултразвучном третману, при различитим процесним параметрима	При оптималним условима третмана, степен конверзије пентоза повећан је за 95,63%, а степен конверзије хексоза за 49,45%; принос добијених производа је износио 36,54% за мрављу киселину, 20,34% за левулинску киселину, 27,54% за 5-HMF и 33,64% за фурфурал	[283]
Кисело-алкални третман	Стабљика је третирана 1% (мас.) сумпорном киселином током 30 min на 120 °C и 1% (мас.) раствором NaOH током 1 h на 120 °C	Из стабљике изоловано 77,6% лигнина, који је коришћен као супстрат за добијање 1 g L <sup>-1</sup> полихидроксиалкалноата, уз принос од 17,6%	[284]

## 2.6. Предмет и циљеви истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације је развијање третмана заснованих на примени нетермалне гасне плазме за добијање фракција лигноцелулозне биомасе и њихово искоришћење у различитим биотехнолошким поступцима. Испитана је могућност примене различитих напредних оксидационих процеса разградње кукурузне стабљике, као и њиховог комбиновања са нетермалном плазмом на атмосферском притиску у конфигурацији плазма игле, како би се повећала ефикасност третмана. У ову сврху одабран је третман нетермалном плазмом у воденој средини, као представник неутралних третмана без примене реагенаса, затим комбиновани нетермална плазма/Фентон третман, као биомиметички третман у киселој средини који се у природи одвија посредством гљива. Испитана је и могућност комбиновања нетермалне плазме са лигниолитичким ензимом манган пероксидазом, по аналогији са природном разградњом. Као модел третман за делигнификацију заступљен у индустрији одабран је алкални третман, који је унапређен нетермалном плазмом. Осим тога, испитиван је и потенцијални синергизам нетермалне плазме са природним дубоким еутектичким смешама, као новом генерацијом „зелених“ органских растварача. Третмани су оптимизовани тако да се обезбеди најефикаснија разградња лигноцелулозе и уклањање лигнина, при условима који су еколошки прихватљиви и „зеленији“ од конвенционалних третмана. Након оптимизације и фракционисања биомасе, извршена је карактеризација изолованих фракција богатих целулозом, хемицелулозом и лигнином. Затим је испитана могућност валоризације третиране биомасе у ферментационим поступцима за добијање млечне киселине, биоетанола и биогаса.

### 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

#### 3.1. Материјали и опрема

У експерименталном раду коришћена је отпадна биомаса стабљике кукуруза, прикупљена као жетвени остаци са пољопривредног газдинства на територији општине Ковин, Јужнобанатски округ, Република Србија.

Током извођења експеримената коришћене су следеће супстанце и реагенси:

- 2,2'-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат) (ABTS) ( $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ ), Thermo Scientific, Индија
- 2',2''-диметил-5,5''-ди-изо-пропилфенолфталеин (тимолфталеин), 95% ( $C_{28}H_{30}O_4$ ), Sigma Aldrich, Уједињено Краљевство
- 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал (DPPH) ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ), Sigma Aldrich, Немачка
- 2-етоксиетанол ( $C_4H_{10}O_2$ ), Fisher Scientific, САД
- 2-хидрокси-терефтална киселина ( $C_8H_6O_5$ ), Fluorochem, Уједињено Краљевство
- 6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина (Тролокс) >98%, ( $C_{14}H_{18}O_4$ ), TCI Chemicals, Кина
- Astra Blue™ ( $C_{47}H_{52}CuN_{14}O_6S_3$ ), Carl-Roth, Холандија
- D-(+)-галактоза, ( $C_6H_{12}O_6$ ), Acros Organics, Белгија
- D-(+)-глукоза, ( $C_6H_{12}O_6$ ), Fisher Scientific, Уједињено Краљевство
- D-(+)-ксилоза ( $C_5H_{10}O_5$ ), Fluka, Немачка
- D-(+)-маноза ( $C_6H_{12}O_6$ ), Acros Organics, Белгија
- Folin-Ciocalteu реагенс, Carlo Erba, Француска
- L-(+)-арабиноза ( $C_5H_{10}O_5$ ), Acros Organics, Белгија
- L-(+)-млечна киселина, 90% ( $C_3H_6O_3$ ), Acros Organics, Белгија
- Амонијум-ацетат-трихидрат ( $CH_3COONH_4 \cdot 3H_2O$ ), Centrohem, Србија
- Антрон, 98% ( $C_{14}H_{10}O$ ), Acros Organics, САД
- Аргон носеће чистоће 5,0, Messer Tehnogas AD, Србија
- Ацетил-бромид, 99% ( $CH_3COBr$ ), Sigma Aldrich, Уједињено Краљевство
- Ацетон ( $C_3H_6O$ ), Lach:ner, Чешка
- Бакар-сулфат-пентахидрат ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), Зорка фарм, Србија
- Водоник-пероксид, 30% ( $H_2O_2$ ), Centrohem, Србија
- Гална киселина ( $C_7H_6O_5$ ), Sigma Aldrich, Кина
- Гвајакол, 99+% ( $C_7H_8O_2$ ), Acros Organics, Белгија
- Гвожђе(II)сулфат-хептахидрат ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ), Lach:ner, Чешка
- Гвожђе(III)хлорид-хексахидрат, 99% ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ), Здравље Лесковац, Србија
- Говеђи серум албумин (BSA), Sigma Aldrich, САД
- Декалин ( $C_{10}H_{18}$ ), Fisher Scientific, САД
- Дестилована вода, Reahem, Србија
- Диметил-сулфоксид ( $C_2H_6OS$ ), Центрохем, Србија
- Динатријум-етилен-диамин-тетра-ацетат (EDTA) ( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ ), Fisher Scientific, САД
- Динатријум-хидроген-фосфат-додекахидрат ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ), Центрохем, Србија
- Етанол, 96% ( $CH_3CH_2OH$ ), Reahem d.o.o, Србија
- Желатин, Carl-Roth, Немачка
- Калијум-натријум-тартарат-тетрахидрат ( $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ ), Fisher Scientific, Уједињено Краљевство
- Калијум-феро-цијанид-трихидрат ( $[K_4(Fe(CN)_6)] \cdot 3H_2O$ ), Merck, Немачка
- Калцијум-карбонат ( $CaCO_3$ ), Nemoss, Србија
- Кварцни песак, Nemoss, Србија
- Крафт лигнин, Sigma Aldrich, САД

- Магнезијум-сулфат-хексахидрат ( $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Зорка фарм, Србија
- Манган-сулфат-моноксид ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), Nemos, Србија
- Метанол, >99,9% ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), Carlo Erba, Француска
- Натријум-ацетат-трихидрат ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), NRK Inženjering, Србија
- Натријум-борат-декахидрат ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), Lach:ner, Чешка
- Натријум-додецил-сулфат ( $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ ), Fisher Scientific, САД
- Натријум-карбонат ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Сига, Србија
- Натријум-лактат, ~60% ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$ ), Fisher Scientific, Уједињено Краљевство
- Натријум-сулфит ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), Merck, Немачка
- Натријум-хидроксид, 99% ( $\text{NaOH}$ ), Nemos, Србија
- Оксална киселина ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ), Зорка фарм, Србија
- Орцинол-моноксид, 99% ( $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$ ), Acros Organics, Кина
- Сафранин ( $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{ClN}_4$ ), Chemapol, Чешка
- Сирћетна киселина, 100% ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), Зорка фарм, Србија
- Сукцинска киселина ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ ), Sigma Aldrich, Кина
- Сумпорна киселина, 95-97% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), Центрохем, Србија
- Терептална киселина, 98% ( $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$ ), Centron, Немачка
- Титанијум(IV)оксисулфат ( $\text{TiO}(\text{SO}_4)$ ), Sigma Aldrich, Уједињено Краљевство
- Три-натријум-цитрат-дихидрат, >99% ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), NRK Inženjering, Србија
- Фенол-црвено ( $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$ ), The Coleman&Bell Co., САД
- Хидроксиламин-хидрохлорид, 98% ( $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ ), Lach:ner, Чешка
- Хлороводонична киселина, 37% ( $\text{HCl}$ ), Зорка фарм, Србија
- Холин-хлорид, 99% ( $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{ClNO}$ ), Thermo Fisher, САД
- Цетил-триметиламонијум-бромид ( $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ ), Carlo Erba, Шпанија
- Цинк-ацетат-дихидрат ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Laforma, Северна Македонија
- Цинк-сулфат-хептахидрат ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), NRK Inženjering, Србија
- Антибиограм тест таблете (Нистатин, 50  $\mu\text{g}$ ; Канамицин, 30  $\mu\text{g}$ ; Стрептомицин, 10  $\mu\text{g}$ ), Bioanalyse®, Турска

У извођењу експерименталног рада коришћена је следећа опрема:

- рН метар, TitroLine 5000, SI Analytics GmbH, Немачка
- Аналитичка вага, Mettler AJ100, Швајцарска
- Аутоклав, Фабрика медицинских уређаја Сутјеска, Србија
- Аутоматизовани систем за тестирање потенцијала за производњу метана, AMPTS II, BPC Instruments, Шведска
- Вакуум упаривач, Buchi, V700, Немачка
- Вибрациона сита, DIN ISO 3310-1, Multiserw, Пољска
- Високо прецизна аналитичка вага, Supermicro S4, Sartorius, Уједињено Краљевство
- Водено купатило, Memmert, Немачка
- Вортекс, LBX Instruments, V05 series, Швајцарска
- Дифрактометар са X зрацима, PW 1050, Philips, САД
- Електрична пећ за жарење, Elektron, Србија
- Елементални анализатор, Elementar Vario EL III, CNS, GmbH, Немачка
- Инфрацрвени спектрометар са Фуријеовом трансформацијом, NicoletTM iSTM 10, Thermo Fisher Scientific, Велика Британија
- Калориметријска бомба, ИКА С 200, ИКА Works, САД
- Куглични млин, Retsch, MM400, Немачка
- Лабораторијска сушница, Фабрика медицинских уређаја Сутјеска, Србија
- Магнетна мешалица, Heating Magnetic Stirrer C-MAG HS 7, ИКА, Немачка
- Микропипете (1-10  $\mu\text{L}$ ; 20-200  $\mu\text{L}$ ; 100-1000  $\mu\text{L}$ ), LLG Labware, Немачка
- Микротом

- Млин са ротирајућим ножевима, Retsch SM100, Немачка
- Орбитална мешалица, Orbital shaker incubator Unimax 1010, Heidolph, Немачка
- Порозиметар са интрузијом живе, Carlo Erba 2000, Италија
- Раман спектрометар, MIRA XTR DS system, Metrohm Raman, САД
- Распршивач, Polaron SC502, Fison Instruments, Уједињено Краљевство
- Светлосни микроскоп, Axio Imager A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH., Немачка
- Систем за течну хроматографију високих перформанси, Dionex Ultimate 3000, ThermoScientific, САД
- Скенирајући електронски микроскоп, Tescan FE-SEM Mira 3 XMU, Tescan, Чешка
- Спектрофлуориметар, Jobin Yvon Fluorolog FL3-22, Horiba, САД
- Спектрофотометар, EpochGen 5, BioTek, САД
- Спектрофотометар, Ultrospec 3300 pro, Biochrom Ltd., Уједињено Краљевство
- Термостат за раст микроорганизама, Memmert, Немачка
- Техничка вага, MP-3000, Chyo Balance Corp, Јапан
- Ултразвучно водено купатило, RO-VEP Elektronska industrija, Србија
- Уређај за одређивање садржаја влакана по Van Soestu, Behrotest® CF 2+2, Behr, Немачка
- Филтери, 0,22 и 0,45  $\mu\text{m}$ , Sartorius, Немачка
- Центрифуга, Hermle Z 206 A, Немачка
- Центрифуга, Mini centrifuge LLG-uniCFUGE5, LLG Labware, Немачка
- Циклонски млин, Foss CT 193 Cyclotec™, Данска

За ензимску хидролизу третиране биомасе, делигнификацију биомасе потпомогнуту нетермалном плазмом и одређивање садржаја млечне киселине коришћени су следећи ензимски препарати, респективно:

- Комерцијална смеша целулаза,  $\beta$ -глукозидаза и хемицелулаза, Cellic® CTec 2, Novozymes, Данска
- Манган пероксидаза изолована из *P. chrysosporium*, EC 1.11.1.13, Sigma Aldrich, Уједињено Краљевство
- Стандардни ензимски кит за одређивање садржаја стереоизомера млечне киселине, Megazyme®, Ирска

За испитивање антимицробне активности изолованих лигнинских фракција коришћени су следећи микроорганизми:

- *Bacillus cereus* ATCC 11778, Колекција: Лабораторија за микробиологију Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду
- *Candida albicans* ATCC 10259, Колекција: Лабораторија за микробиологију Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду
- *Escherichia coli* ATCC 25922, Колекција: Лабораторија за микробиологију Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Колекција: Лабораторија за микробиологију Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду

За млечно-киселинску ферментацију, алкохолну ферментацију и анаеробну дигестију третиране биомасе коришћени су следећи микроорганизми, респективно:

- *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469, Колекција: Лабораторија за микробиологију Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *elipsoides*, Колекција: Лабораторија за микробиологију Технолошко-металуршког факултета, Универзитета у Београду
- Инокулум преузет из реактора за анаеробну дигестију смештеног у постројењу за третман отпадних вода Severn Trent (Wanlip, Уједињено Краљевство)

За припрему одговарајућих хранљивих медијума за микроорганизме коришћени су:

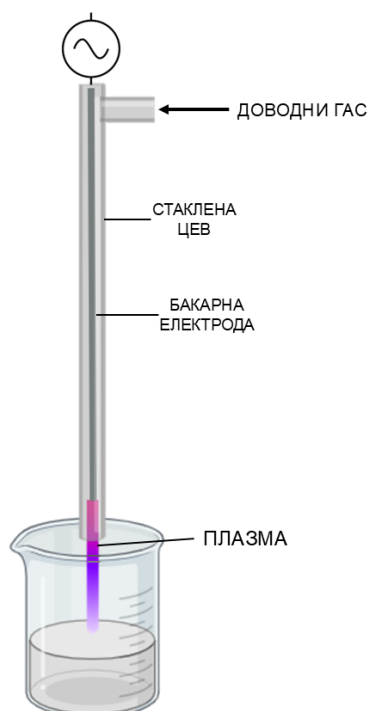
- De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) бујон, Biolife, Италија
- Агар, Торлак, Србија
- Квашчев екстракт, Торлак, Србија
- Месни екстракт, Торлак, Србија
- Пептон, Торлак, Србија
- Сладни бујон, Biolife, Италија
- Триптон, Торлак, Србија
- Хранљиви бујон, Biolife, Италија

За аквизицију и обраду података коришћени су следећи софтверски пакети:

- *AMPTS II*, за биохемијски потенцијал метана
- *Biorender*, за прављење схема и слика представљених у раду
- *Chromeleon 7.2 CDS*, за конструисање хроматограма добијених применом течне хроматографије високих перформанси
- *Fityk*, за конструисање, обраду и деконволуцију спектра добијених применом рендгенске дифракционе анализе
- *Milestone 200* – за конструисање кумулативних кривих добијених применом порозиметрије са интрузијом живе
- *Minitab<sup>®</sup> 18* – за дизајн и оптимизацију комбинованог нетермална плазма/природне дубоке еутектичке смеше третмана
- *MiraCal DS 1.2.55.0* – за конструисање и обраду спектра добијених применом Раман спектроскопије
- *OriginPro<sup>®</sup> 9.0* – за статистичку обраду и графичко приказивање експерименталних резултата

### 3.2. Извори нетермалне плазме

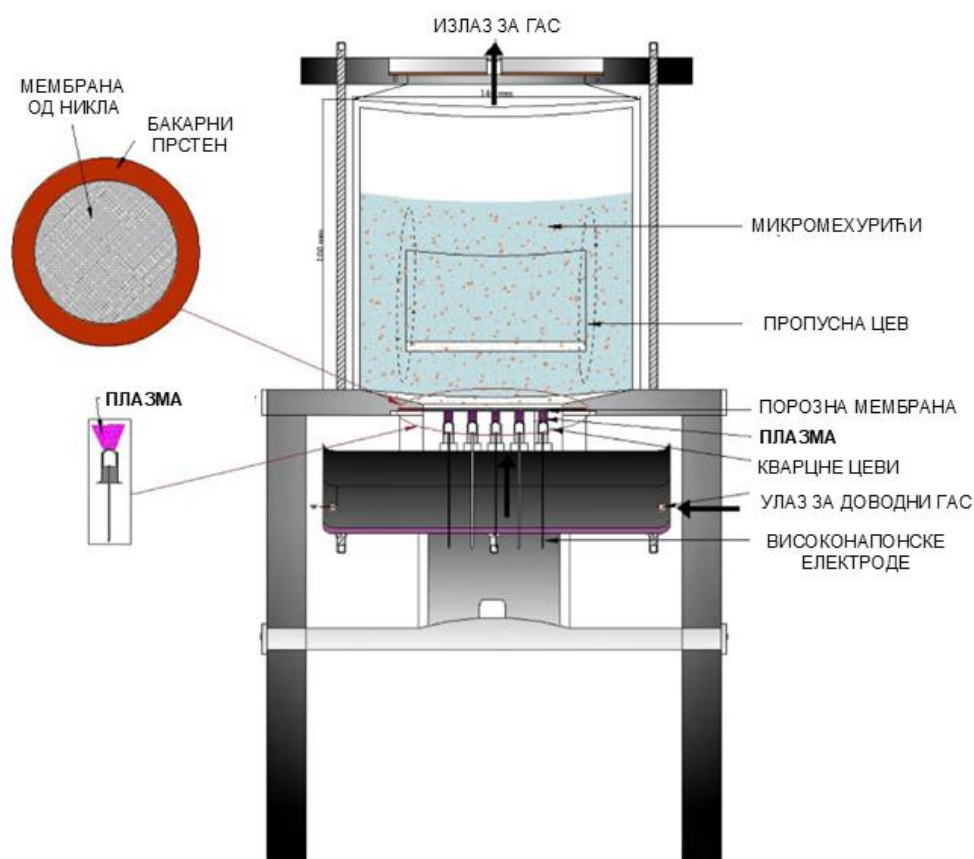
Током израде ове дисертације коришћена је нетермална плазма игла наменски развијена на Институту за физику Универзитета у Београду. Схематски приказ нетермалне плазма игле коришћене у експерименталном раду представљен је на слици 3.1.



Слика 3.1. Схематски приказ нетермалне плазма игле

Тело плазме је израђено од тefлона, а централна бакарна електрода пречника 0,1 mm је постављена управно кроз боросиликатну стаклену цев пречника 1,2 mm, кроз коју пролази напојни гас. Бакарна електрода је повезана на комерцијално напајање номиналне снаге 2 W (Conrad Electronic SE, Немачка). Као доводни гас у свим експериментима коришћен је аргон носеће чистоће 5.0 (99,999%), протока 0,5 slm (енгл. *Standard litre per minute*), односно  $8,33 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ . Растојање врха игле од површине узорка је варирано у зависности од потреба експеримената, а кретало се у опсегу од 1 cm до 1,5 cm. Физичка својства нетермалне плазма игле, попут јачине електричног поља, оптичке и аудио карактеризације, испитана су од стране Zaplotnik и сар. (2014) [285]. У даљем тексту, зарад једноставности, нетермална плазма игла ће бити означена као „плазма“, односно као „плазма игла“.

Осим нетермалне плазма игле, карактеристичне за истраживања на лабораторијском нивоу, у експерименталном раду је коришћен и нетермални плазма реактор са диелектричним баријерним пражњењем, како би се испитала могућност скалирања процеса. Овај реактор је конструисала група истраживача Катедре за хемијско инжењерство Лофборо универзитета (Уједињено Краљевство). Схематски приказ нетермалног плазма реактора са диелектричним баријерним пражњењем представљен је на слици 3.2.



Слика 3.2. Схематски приказ нетермалног плазма реактора са диелектричним баријерним пражњењем (преузето и прилагођено према [286])

Реактор се састоји из два дела – тела реактора, тј. резервоара у коме се налази узорак који се третира, и плазма модула, смештеног испод резервоара, у коме настаје пражњење. Резервоар је израђен од плексигласа, а радна запремина износи 1 L. Унутар резервоара су смештене пропусне цеви унутрашњег пречника 80 mm, помоћу којих се обезбеђује ефикасније мешање. Плазма модул се састоји од 19 високонапонских електрода које су постављене паралелно, са размаком од 14 mm, и међусобно повезане прстеном од нерђајућег челика. Електроде су сачињене од шипки од нерђајућег челика, дужине 90 mm и пречника 7 mm, смештених унутар кварцне цеви дебљине зида 1,5 mm. На овај начин омогућено је стварање

уједначеног пражњења по читавој површини плазма модула. Електроде су повезане на резонантно напајање, а плазма је генерисана на 15,6 kV<sub>pp</sub> и 23 kHz, са радним циклусом од 45% и временом рада од 100 ms, како би се ограничило загревање гаса. Резервоар и плазма модул су међусобно раздвојени мембраном израђеном од никла, причвршћеном за бакарни прстен и смештеном унутар алуминијумског оквира. Ова мембрана има двојаку улогу. Због свог положаја служи као уземљена електрода која је неопходна за генерисање диелектричног пражњења. Осим тога, захваљујући порама реда величине 20 μm, мембрана служи и за стварање финих тзв. „микромехурића“, који обезбеђују ефикаснији пренос масе насталих реактивних врста по читавој запремини третираног узорка. Величина ових мехурића се контролише и по потреби редукује помоћу флуидног осцилатора. Растојање између мембране и електрода износи приближно 1,5 mm. Напојни гас улази у резервоар радијално кроз плазма модул. Као доводни гас у експерименту коришћен је компримовани ваздух протока 5 slm, односно  $8,33 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ . Детаљна карактеризација физичких карактеристика овог реактора описана је од стране Wright и сар. (2019) [287]. У даљем тексту, зарад једноставности, нетермални плазма реактор са диелектричним баријерним пражњењем ће бити означен као „плазма реактор“.

### 3.3. Припрема биомасе

У раду су коришћене стабљике кукуруза са два локалитета, добијене из пољопривредних газдинстава у јужном Банату (узорак 1) и источној Србији (узорак 2). Прикупљена је стабљика која би иначе била подвргнута спаљивању или одбачена на депонију. Стабљике су најпре испране водом, како би се физички уклонили остаци земље и других нечистоћа. Након сечења на комаде дужине од 8 cm до 10 cm, стабљике су потопљене у 50% раствор етанола, како би се уклонили воскови и друге екстрактивне материје. Овим кораком је уједно олакшано даље уситњавање стабљике. Механички третман биомасе зависио је од потреба анализа и експеримената који су вршени у даљем раду.

За експерименте диференцијалног бојења (одељак 3.7.10.) коришћени су узорци добијени сечењем стабљике на микротому, да би се добили уједначени и прецизни пресеци. Овако добијени попречни пресеци стабљике чувани су у дестилованој води, како би се избегло механичко оштећење узорака који услед сушења постају крти.

Одређивање садржаја влакана методом по Van Soest-у (одељак 3.7.1.) вршено је у сировој кукурузној стабљивици чија је величина честица износила  $\approx 1 \text{ mm}$ . Након одлежавања у 50% етанолу, омекшале кукурузне стабљике су сечене на тзв. листиће ручно, помоћу скалпела. Након сушења на собној температури током 24 h, листићи су уситњени у кугличном млину при фреквенцији од  $20 \text{ s}^{-1}$ , у временском интервалу од 30 s до 1 min. Овако уситњена стабљика чувана је на је на собној температури у полипропиленској кутији до извођења експеримената.

У свим третманима комбинованим са нетермалном плазмом (поглавље 3.5.) коришћена је фино уситњена биомаса. Након одлежавања у 50% етанолу, омекшале кукурузне стабљике су сечене на комаде дужине од 1 cm до 2 cm ручно, помоћу скалпела. Након сушења на собној температури током 24 h, ови комади су уситњени комбинованим млевењем у млину са ротирајућим ножевима и циклонском млину. Након млевења, биомаса је просејана кроз вибрациона сита различитог пречника, тако да је финална величина честица износила 0,3 mm. Самлевена биомаса чувана је на собној температури у полипропиленској кутији до извођења експеримената.

Сирова лигнинска фракција коришћена је за поређење промена у структури лигнинских фракција изолованих након примењених третмана. Ова фракција добијена је физичким одвајањем коре стабљике и спроводних снопића, који су доминантно изграђени од лигнина. Након издвајања и млевења, добијена лигнинска фракција је чувана на собној температури у полипропиленској кутији до извођења експеримената.

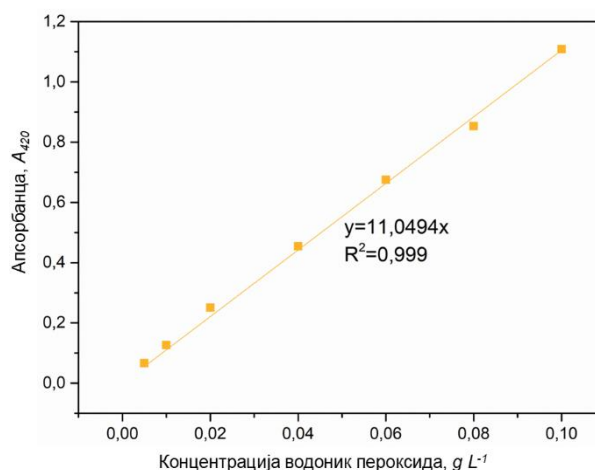
### 3.4. Карактеризација плазма активираних воде

Физичка својства различитих извора нетермалне плазме коришћених у овом раду детаљно су описана у одељку 3.2. Међутим, како је нетермална плазма коришћена за производњу реактивних кисеоничних и азотних врста, неопходно је извршити и њену хемијску карактеризацију. Дестилована вода је активирана применом плазма игле у циљу детекције и одређивања концентрације реактивних врста насталих током третмана. Одмерено је 10 mL дестиловане воде и пребачено у стаклене бочице. Како је пенетрациона моћ плазме уско повезана са висином нивоа течности у суду, сваки узорак је одмерен у идентичним судовима. Дестилована вода је затим подвргнута третману плазмом током различитих временских интервала, од 30 s до 90 min. Третмани су вршени на собној температури и уз мешање на магнетној мешалици, а растојање површине узорка од врха игле износило је 1 cm. Одмах након третмана, у плазма активираној води је одређивана рН вредност, као и концентрација насталог водоник пероксида и јона нитрата и нитрита, одабраних као представника кисеоничних и азотних реактивних врста. Осим тога, праћена је и промена ових параметара један и 24 h након третмана, како би се утврдила стабилност насталих врста током чувања на собној температури. Такође, у склопу хемијске карактеризације извршено је и одређивање концентрације хидроксил радикала насталих током третмана плазмом. Међутим, због природе ових радикала и изузетно кратког трајања полуживота, мерења су вршена након плазма третмана раствора терефталне киселине уместо дестиловане воде, према стандардној методи.

#### 3.4.1. Одређивање концентрације водоник пероксида

Концентрација водоник пероксида је одређивана спектрофотометријском методом са титанијум (IV) оксисулфатом, у складу са стандардом DIN 38409 H15 [288]. Водоник пероксид присутан у узорку са титанијум (IV) оксисулфатом гради комплекс жуте боје. Интензитет обојења пропорционалан је концентрацији присутног водоник пероксида и одређује се на таласној дужини од 420 nm.

У 1 000  $\mu\text{L}$  испитиваног узорка додато је 100  $\mu\text{L}$  раствора титанијум (IV) оксисулфата. Мерење апсорбанце на 420 nm вршено је након 5 min, преношењем 200  $\mu\text{L}$  раствора у микротитарску плочу. Концентрација водоник пероксида је прерачуната на основу стандардне праве (слика 3.3.), добијене мерењем апсорбанце раствора водоник пероксида познатих концентрација (од 0,005  $\text{g L}^{-1}$  до 0,010  $\text{g L}^{-1}$ ) на 420 nm.



Слика 3.3. Стандардна права зависности концентрације водоник пероксида од апсорбанце мерене на 420 nm

Концентрација водоник пероксида ( $c_{\text{H}_2\text{O}_2}$ ) израчуната је према једначини:

$$c_{\text{H}_2\text{O}_2} (\text{g L}^{-1}) = \frac{A_{420}}{11,0494} \cdot R \quad (3.1)$$

где је  $A_{420}$  апсорбанца измерена на 420 nm, а  $R$  фактор разблажења узорка.

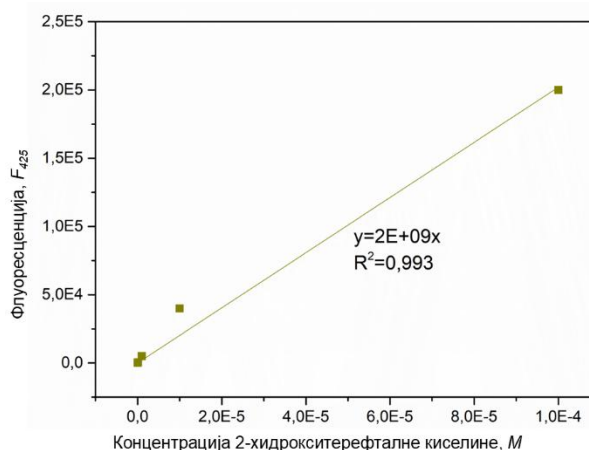
### 3.4.2. Одређивање концентрације јона нитрата и нитрита

Одређивање концентрације јона нитрата и нитрита, као доминантних азотних врста које настају током третмана плазмом, вршено је семиквантитативном методом, тракама за анализу (Quantofix<sup>®</sup>, Macherey-Nagel, Немачка). Ове траке могу да детектују јоне нитрата у опсегу концентрација од 10 mg L<sup>-1</sup> до 500 mg L<sup>-1</sup>, а јоне нитрита у опсегу концентрација од 1 mg L<sup>-1</sup> до 80 mg L<sup>-1</sup>. Трака за анализу је урођена у узорак у трајању од 1 секунде. Вишак воде је уклоњен са траке и након 1 min је очитана вредност концентрације јона нитрата и нитрита на основу подударача боје на скали датој од стране произвођача са бојом која је развијена на траци за анализу након њеног урањања у узорак.

### 3.4.3. Одређивање концентрације хидроксил радикала

Концентрација хидроксил радикала насталог током третмана плазмом одређивана је хемијском дозиметријом [289]. Терефтална киселина је коришћена као тзв. селективни „хватач“ хидроксил радикала који не реагује са другим кисеоничним радикалима, попут O<sub>2</sub><sup>-</sup>, HO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Метода се заснива на превођењу терефталне киселине до 2-хидрокситерефталне киселине у присуству хидроксил радикала. Концентрација настале 2-хидрокситерефталне киселине се може детектовати мерењем емисије на 425 nm. Излагање раствора који садржи молекуле терефталне и 2-хидрокситерефталне киселине UV светлости на 310 nm доводи до емисије 2-хидрокситерефталне киселине на 425 nm, док молекули терефталне киселине не показују флуоресценцију.

Терефтална киселина се не раствара у киселим и неутралним растварачима, те је за припрему овог раствора коришћен 5 mM натријум хидроксида. Најпре је припремљен 2 mM раствор терефталне киселине растварањем терефталне киселине у 5 mM воденом раствору натријум хидроксида. Добијени раствор је третиран плазма иглом у различитим временским интервалима (30 s до 10 min). Флуоресценција плазма активiranог раствора терефталне киселине мерена је непосредно након третмана, најпре побуђивањем на 310 nm помоћу ксенонске лампе снаге 450 W, а затим мерењем сигнала флуоресценције на 425 nm. Концентрација хидроксил радикала насталих током третмана нетермалном плазмом прерачуната је на основу стандардне праве (слика 3.4.), добијене мерењем интензитета флуоресценције раствора 2-хидрокситерефталне киселине познатих концентрација (од 10<sup>-8</sup> M до 10<sup>-5</sup> M), побуђивањем на 310 nm и мерењем на 425 nm.



Слика 3.4. Стандардна права зависности концентрације 2-хидрокситерефталне киселине од флуоресценције мерене на 425 nm

Концентрација хидроксил радикала ( $c_{OH}$ ) израчуната је према једначини:

$$c_{OH}(M) = \frac{F_{425}}{2 \cdot E+09} \cdot R \quad (3.2)$$

где је  $F_{425}$  флуоресценција измерена на 425 nm, а  $R$  фактор разблажења узорка.

### 3.5. Третмани биомасе

Ради одабира услова за третман биомасе плазмом, неопходно је утврдити погодан однос биомасе и реагенса при којем ће бити припремане суспензије за третмане нетермалном плазмом. Испитана је могућност примене хидромодула 1:10, 1:15, 1:20 и 1:30 (биомаса: течни медијум; g:mL). Суспензије су припремане мешањем 500 mg биомасе са одговарајућим запреминама дестиловане воде. Припремљене суспензије су затим подвргнуте третману плазма иглом током 30 min уз мешање на магнетној мешалици, након чега су узорци инкубирани 24 h на 35 °C, како би реактивне врсте настале током третмана плазмом имале довољно времена да прореагују са биомасом. Након инкубације, чврста и течна фаза раздвојене су центрифугирањем (6 000 rpm, 10 min). Чврста фаза, односно третирана биомаса, испрана је дестилованом водом три пута, како би се уклониле евентуалне заостале врсте и неутралисала биомаса. Третирана биомаса је затим осушена у сушници преко ноћи на 60 °C. У осушеној биомаси је одређен садржај лигнина растворљивог у ацетил бромиду према методи која ће бити детаљно описана у одељку 3.7.3., како би се проценио утицај примењених хидромодула на ефикасност делигнификације биомасе.

#### 3.5.1. Комбиновани нетермална плазма/вода третман

Биомаса је помешана са дестилованом водом у односу чврсто-течно 1:20 (g:mL). Одмерено је 500 mg биомасе у ерленмајеру и преливено са 10 mL дестиловане воде. Овако припремљени узорци третирају се плазма иглом на собној температури током 30 min, 60 min и 90 min, како би се испитао утицај дужине третмана на делигнификацију кукурузне стабљике. Растојање између врха плазма игле и површине узорака износило је 1,5 cm, док је третман вршен уз константно мешање узорака помоћу магнетне мешалице. Након третмана, ерленмајери су затворени, чепови су осигурани парафилмом и узорци су постављени на инкубацију на 35 °C током 24 h, уз мешање (130 rpm), како би реактивне врсте настале током третмана плазмом имале времена да прореагују са биомасом. Након инкубације, чврста и течна фаза раздвојене су центрифугирањем (6 000 rpm, 10 min). Чврста фаза, односно третирана биомаса, испрана је дестилованом водом три пута, како би се уклониле евентуалне заостале врсте и неутралисала биомаса. Третирана биомаса је затим осушена у сушници преко ноћи на 60 °C и чувана је у полипропиленским кесицама на сувом до даље употребе. Схематски приказ третмана представљен је на слици 3.5.



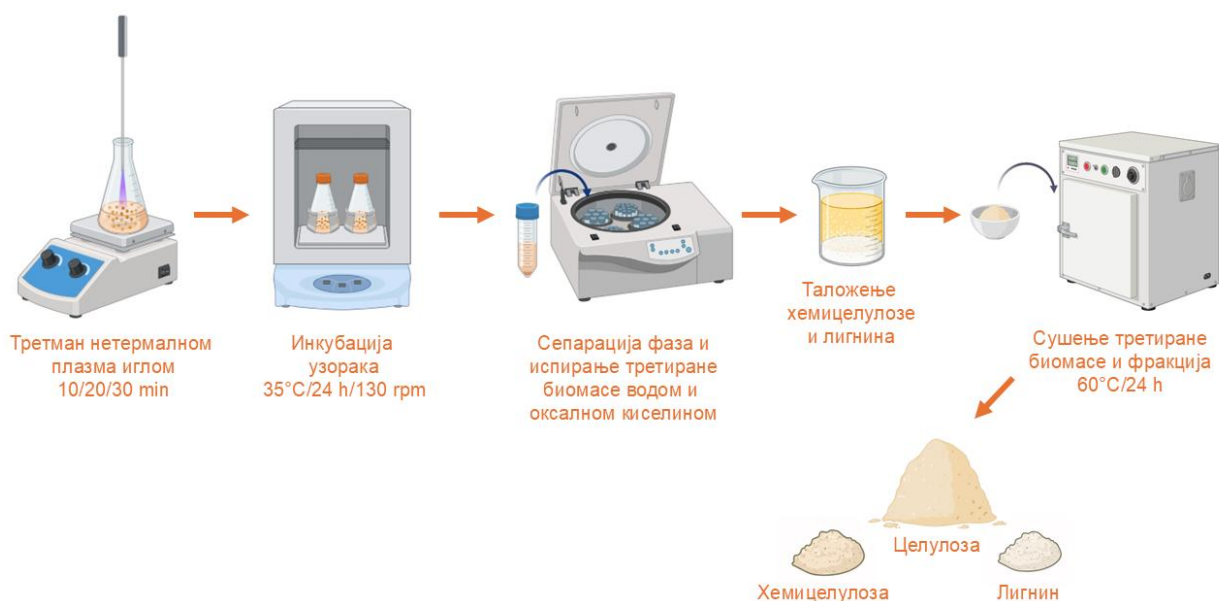
Слика 3.5. Схематски приказ комбинованог нетермална плазма/вода третмана

#### 3.5.2. Комбиновани нетермална плазма/Фентон третман

Комбиновани нетермална плазма/Фентон третман је оптимизован у циљу постизања највеће делигнификације. Оптимизација је вршена варирањем четири параметра: извора јона гвожђа, односа соли гвожђа и водоник пероксида који улазе у састав Фентоновог реагенса, дужине трајања третмана и редоследа третмана. Две врсте соли су коришћене као извор јона гвожђа -  $\text{FeCl}_3$  и  $\text{FeSO}_4$ . Масени однос соли гвожђа и водоник пероксида у Фентоновом реагенсу подешен је на 1:5 и 1:25. Један сет узорака је припремљен мешањем биомасе са воденим раствором водоник пероксида одговарајуће концентрације, подвргнут третману

плазмом, након чега је додата одговарајућа маса соли гвожђа како би настао Фентонов реагенс. У другом сету узорака, биомаса је најпре помешана са Фентоновим реагенсом који је садржао одговарајуће масе соли гвожђа и концентрације водоник пероксида, а затим подвргнута третману плазмом. Биомаса је помешана са Фентоновим реагенсом у односу чврсто-течно 1:20 (g:mL). Одмерено је 500 mg биомасе у ерленмајеру и преливено са 10 mL раствора водоник пероксида, односно Фентоновог реагенса. Овако припремљени узорци третирају се плазма иглом на собној температури током 10 min, 20 min и 30 min, како би се испитао утицај дужине третмана на делигнификацију кукурузне стабљике. Растојање између врха плазма игле и површине узорака износило је 1,5 cm, док је третман вршен уз константно мешање узорака помоћу магнетне мешалице. Како би се испитао допринос нетермалне плазме, припремљени су и узорци код којих је примењен само третман Фентоновим реагенсом, без третмана плазмом. Након третмана и додавања соли гвожђа у одговарајуће узорке, ерленмајери су затворени, чепови су осигурани парафилмом и узорци су постављени на инкубацију на 35 °C током 24 h, односно 48 h, уз мешање (130 rpm). Како је Фентонова реакција сложена реакција која се одиграва по ланчаном механизму, накнадна инкубација узорака је неопходна да би се обезбедило довољно времена да се ова реакција одигра до краја, односно да сва количина Фентоновог реагенса прореагује са биомасом. Након инкубације, чврста и течна фаза раздвојене су центрифугирањем (6 000 rpm, 10 min). Чврста фаза, односно третирана биомаса, испрана је дестилованом водом, 5% (мас.) оксалном киселином и поново дестилованом водом, како би се уклониле евентуалне заостале честице гвожђа и неутралисала биомаса. Третирана биомаса је затим осушена у сушници преко ноћи на 60 °C и чувана је у полипропиленским кесицама на сувом до даље употребе.

У течној фракцији након третмана заостају хемицелулоза и лигнин који су растворени током третмана. Ове фракције су изоловане применом методе коју су развили Su и сар. (2015), редоследом прилагођеним почетној рН вредности течне фракције [290]. Течној фракцији је рН вредност подешена на 5,5 помоћу 6 M хлороводоничне киселине. Након додавања 96% етанола у односу 1:4 (v/v), узорци су инкубирани на собној температури у статичним условима минимум 8 h, како би се исталожила хемицелулоза. Исталожена хемицелулоза је изолована центрифугирањем као чврста фракција, испрана 70% етанолом, осушена и чувана за даљу употребу. Заостала течна фракција је најпре концентрисана четири пута упаравањем етанола, а затим јој је рН подешен на 1,5. Закишељена течна фракција је остављена у статичним условима на 4 °C минимум 4 h како би се лигнин нерастворан у киселинама исталожио. Овако добијени лигнин испран је закишељеном водом (рН 2,0), осушен и чуван за даљу употребу. Схематски приказ третмана представљен је на слици 3.6.

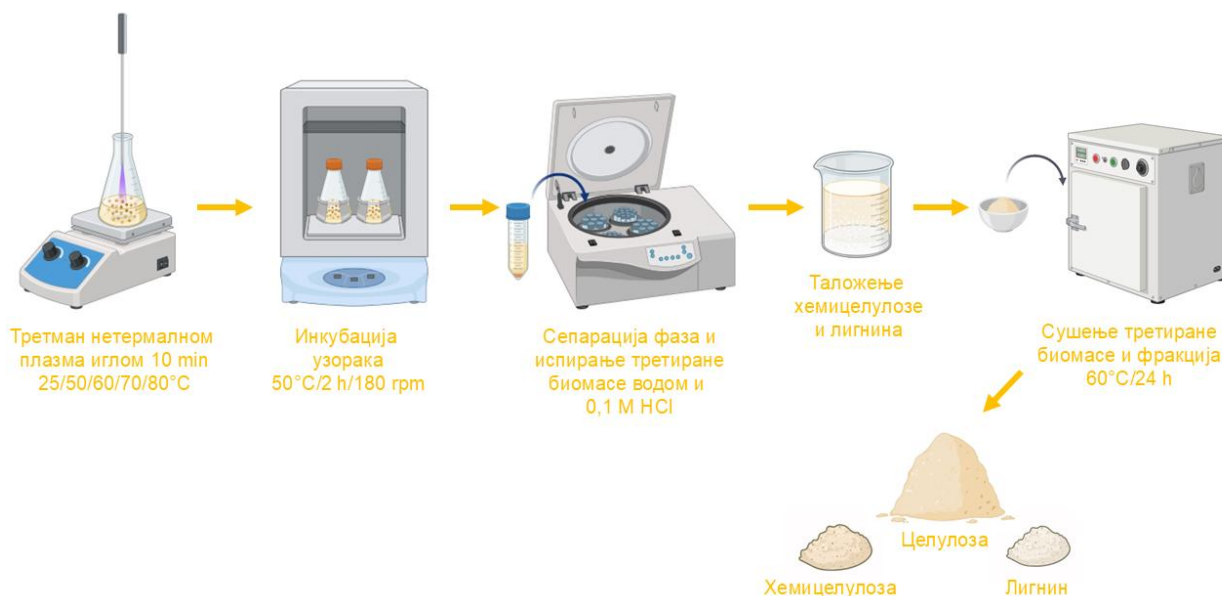


Слика 3.6. Схематски приказ комбинованог нетермална плазма/Фентон третмана

### 3.5.3. Комбиновани нетермална плазма/алкални третман

За третман кукурузне стабљике у алкалној средини припремљен је алкални раствор водоник пероксида. Најпре је припремљен 2% алкални раствор водоник пероксида, подешавањем рН вредности на 11,5 помоћу 5 М натријум хидроксида. Биомаса је помешана са 2% алкалним раствором водоник пероксида у односу биомаса и реагенс 1:20 (g:mL). Одмерено је 500 mg биомасе у ерленмајеру и преливено са 10 mL овог раствора. Овако припремљени узорци третирају се плазма иглом на собној температури, 50 °C, 60 °C, 70 °C и 80 °C током 10 min, како би се испитао утицај температуре на делигнификацију кукурузне стабљике. Растојање између врха плазма игле и површине узорака варијало је између 1 cm и 1,5 cm услед стварања пене током третмана, док је константно мешање и загревање узорака обезбеђено применом магнетне мешалице. Осим тога, на један сет узорака је примењен само третман алкалним раствором водоник пероксида током 10 min на собној температури, 50 °C, 60 °C, 70 °C и 80 °C, без додатног третмана плазмом, како би се испитао допринос нетермалне плазме. Након третмана, ерленмајери су затворени, чепови су осигурани парафилмом и узорци су постављени на инкубацију на 50 °C током 2 h, уз мешање (180 rpm), како би реактивне врсте настале током третмана плазмом имале времена да прореагују са биомасом. Након инкубације, чврста и течна фаза раздвојене су центрифугирањем (6 000 rpm, 10 min). Чврста фаза, односно третирана биомаса, испрана је дестилованом водом, 0,1 М хлороводоничном киселином и поново дестилованом водом, како би се неутралисала биомаса. Третирана биомаса је затим осушена у сушници преко ноћи на 60 °C и чувана је у полипропиленским кесицама на сувом до даље употребе.

У течној фракцији након третмана заостају хемицелулоза и лигнин који су растворени током третмана. Таложење и изоловање хемицелулозе и лигнина из течне фракције вршено је на исти начин као и након комбинованог нетермална плазма/Фентон третмана, према процедури описаној у одељку 3.5.2 [290]. Схематски приказ третмана представљен је на слици 3.7.



Слика 3.7. Схематски приказ комбинованог нетермална плазма/алкалног третмана

### 3.5.4. Комбиновани нетермална плазма/природне дубоке еутектичке смеше третман

Комбиновани нетермална плазма игла/природне дубоке еутектичке смеше (NADES) третман оптимизован је применом Тагучијевог ортогоналног дизајна експеримената у циљу постизања највеће делигнификације. Оптимизација је вршена варирањем кључних фактора третмана који имају највећи утицај на делигнификацију – односа холин хлорида и млечне киселине који улазе у састав NADES, садржаја воде која се додаје еутектичкој смеси и дужине

трајања третмана. Тагучијев дизајн L9 (3<sup>3</sup>) је конструисан варирањем поменутих фактора на три различита нивоа. Вредности ових фактора су комбиноване у девет различитих експерименталних поставки, а услови при којима су ови експерименти извођени приказани су у табели 3.1.

Табела 3.1. Кључни параметри третмана и њихове вредности у Тагучијевом дизајну експеримената

Број експеримента	Фактор		
	ChCl:LA* однос	Садржај воде (мас. %)	Дужина третмана (min)
1	1:2	10	10
2	1:2	20	20
3	1:2	30	30
4	1:5	10	20
5	1:5	20	30
6	1:5	30	10
7	1:10	10	30
8	1:10	20	10
9	1:10	30	20

\*ChCl:LA – молски однос холин хлорида и млечне киселине у еутектичкој смеси

Степен делигнификације је одабран као процесни одговор, а подаци су прикупљени у облику односа сигнал-шум ( $S/N$ , енгл. *Signal-to-Noise*). Како је циљ третмана постићи што већу делигнификацију,  $S/N$  однос је прерачунат коришћењем критеријума „*veће је боље*“ (енгл. *"larger is better"*), према једначини [291]:

$$S/N = -10 \log_{10} \left[ \frac{1}{n} \sum \frac{1}{y^2} \right] \quad (3.3)$$

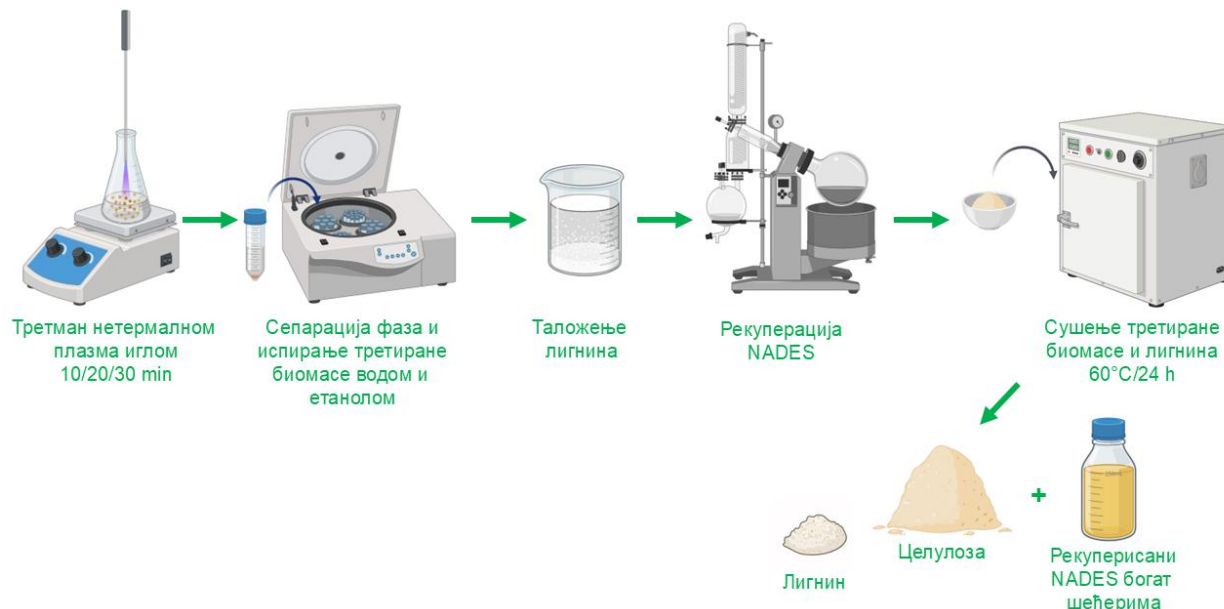
где је  $y$  измерена вредност, тј. процесни одговор за одговарајућу комбинацију вредности процесних параметара, а  $n$  је број мерења.

Након дефинисања услова за извођење експеримената припремљене су одабране NADES смеше мешањем одговарајућих маса холин хлорида и млечне киселине тако да молски односи ових компоненти буду 1:2, 1:5, односно 1:10. Смеше су инкубиране у воденом купатилу на 80 °C уз константно мешање до формирања транспарентне вискозне смеше без боје (30 min до 1 h) [292]. Припремљене смеше су затим охлађене до собне температуре. Уколико након хлађења није дошло до формирања кристала, припремљене смеше су стабилне и спремне за употребу. Међутим, уколико током хлађења настану кристали, неопходно је поновити процес загревања, а затим и хлађења еутектичке смеше.

Биомаса је помешана са NADES-ом у односу чврсто-чврсто 1:20 (g:g). Одмерено је 500 mg биомасе у ерленмајеру и преливено са 10 g еутектичке смеше у коју је претходно додат одговарајући садржај воде како би се смањило вискозитет NADES и тиме повећала ефикасност третмана. Овако припремљени узорци третирану су плазма иглом на собној температури током 10 min, 20 min или 30 min, у зависности од поставке експеримента. Растојање између врха плазма игле и површине узорака износило је 1 cm, док је третман вршен уз константно мешање узорака помоћу магнетне мешалице. Након третмана, у реакциону смешу је додато 10 mL 96% етанола, чиме је омогућено задржавање већине екстрахованог лигнина у течной фракцији [293]. Раздвајање чврсте и течне фракције вршено је центрифугирањем (6 000 rpm, 10 min). Чврста фаза, односно третирана биомаса, испрана је 96% етанолом и дестилованом водом, како би се уклонила заостала NADES и неутралисала биомаса. Третирана биомаса је затим осушена у сушници преко ноћи на 60 °C и чувана је у полипропиленским кесицама на сувом до даље употребе.

У течной фракцији након третмана заостају лигнин и полисахариди који су растворени током третмана. Како би се екстраховани лигнин исталожио у течну фракцију је додата

дестилована вода у односу 1:2 (v/v) и меша је остављена у статичним условима на 4 °C преко ноћи [293]. Исталожене лигнин је изолован вакуум филтрацијом, испран водом како би се уклонили остаци еутектичке меше и етанола, осушен и чуван до даље употребе. Након изоловања лигнина, додата вода и 96% етанол су уклоњени из течне фракције вакуум упаравањем, при чему је заостала течна фаза која представља рекуперисану NADES богату шећерима. Схематски приказ овог третмана представљен је на слици 3.8.



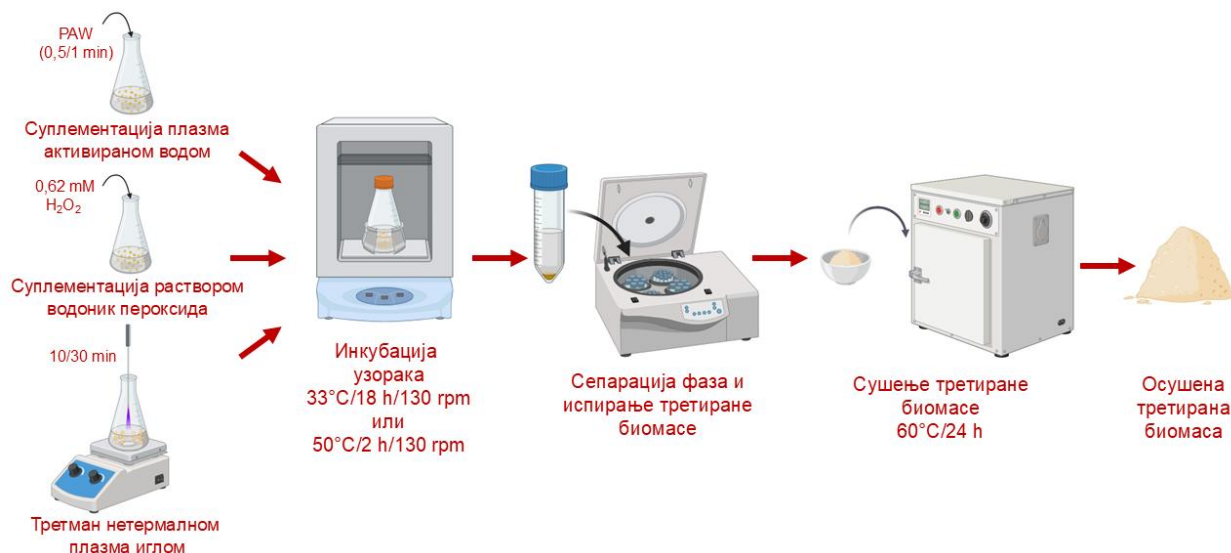
Слика 3.8. Схематски приказ комбинованог нетермалног плазма игла/природне дубоке еутектичке меше третмана

Након утврђивања оптималних услова за извођење комбинованог плазма игла/NADES третмана, исти услови су примењени за третман биомасе NADES-ом у плазма реактору [286]. Одмерено је 1,5 g фино уситњене биомасе и преливено са 30 g NADES која је садржала холин хлорид и млечну киселину у односу 1:2, а у коју је претходно додато 10% дестиловане воде. Припремљена суспензија је третирана у плазма реактору 30 min. Мешање суспензије је обезбеђено стварањем микромехурића, а плазма је генерисана помоћу компримованог ваздуха који је коришћен као доводни гас, са протоком од 5 slm. Осим тога, припремљен је и контролни узорак третиран само еутектичком мешом, како би се проценио допринос плазма игле и плазма реактора повећању ефикасности примењеног третмана. Контролни узорак је припремљен мешањем биомасе и NADES (ChCl:LA=1:2) у односу чврсто-чврсто 1:20 (g:g). Припремљена суспензија је инкубирана на собној температури током 30 min, уз мешање помоћу магнетне мешалице. Након завршетка третмана, раздвајање и изоловање третиране биомасе, лигнина и NADES извршено је на исти начин као у узорцима третираним комбинованим плазма игла/NADES третманом.

Рекуперисана NADES богата шећерима, која заостаје након третмана биомасе NADES-ом, односно комбинованим плазма игла/NADES третманом, испитана је као супстрат за раст бактерија млечне киселине. На овај начин испитана је могућност њене валоризације кроз производњу високо вредних производа у ферментационим процесима. У рекуперисаним NADES најпре је одређена концентрација шећера применом течне хроматографије високих перформанси. Детаљан опис ове методе биће приказан у поглављу 3.7.14. Након тога, мешама је подешена pH вредност на 6,5 помоћу натријум хидроксида, а затим су разблажене три пута. Рекуперисане меше су потом стерилисане филтрирањем кроз 0,22  $\mu\text{m}$  филтер, а сама ферментација је вршена према протоколу који ће детаљно бити описан у одељку 3.8.1.

### 3.5.5. Комбиновани нетермална плазма/ензимски третман

За ензимски третман кукурузне стабљике манган пероксидазом неопходно је присуство водоник пероксида. Како би се испитала могућност суплементације медијума водоник пероксидом који потиче из различитих извора, направљена су три сета узорака. У један сет узорака додат је раствор водоник пероксида, у другом сету узорака као извор водоник пероксида коришћена је плазма активирана вода, док је трећи сет узорака најпре третиран плазмом, како би се генерисала потребна концентрација пероксида, а затим је уследило додавање ензима. У сва три случаја је биомаса помешана са одговарајућим раствором у односу чврсто-течно 1:20 (g:mL). Одмерено је 500 mg биомасе у ерленмајеру и преливено са по 10 mL 0,62 mM раствора комерцијалног водоник пероксида, плазма активиране воде добијене активирањем током 0,5 min и 1 min, односно дестиловане воде. Узорци помешани са дестилованом водом су подвргнути третману плазма иглом током 10 min и 30 min, како би се генерисало довољно водоник пероксида. Такође, у све узорке је додат и 1,25 mM раствор манган сулфата, који је неопходан за започињање каталитичког циклуса MnP. Комерцијална MnP, изолована из *P. chrysosporium*, специфичне активности 580 U g<sup>-1</sup>, додавана је у супстрате у концентрацији од 1 mg по граму биомасе. Раствор MnP је прављен у 0,25 M натријум лактатном пуферу рН вредности 4,5. Након додавања ензима, узорци су инкубирани на 35 °C током 18 h, уз мешање (130 rpm). Након инкубације, чврста и течна фаза раздвојене су центрифугирањем (6 000 rpm, 10 min). Чврста фаза, односно третирана биомаса, испрана је дестилованом водом три пута, како би се уклонио заостали водоник пероксид и неутралисала биомаса. Третирана биомаса је затим осушена у сушници преко ноћи на 60 °C и чувана је у полипропиленским кесицама на сувом до даље употребе. Такође, како би се испитала ефикасност примењеног третмана на повишеној температури, која уједно представља и температурни оптимум овог ензима, одабрани узорци су инкубирани на 50 °C током 2 h, уз мешање (130 rpm). Након инкубације, сепарација фаза је извршена на претходно описан начин. Схематски приказ ензимског третмана представљен је на слици 3.9.



Слика 3.9. Схематски приказ комбинованог нетермална плазма игла/ензимског третмана

#### 3.5.5.1. Одређивање активности манган пероксидазе

За одређивање активности манган пероксидазе коришћена је измењена метода развијена од стране Aroга и сар. (2005) [294]. Ова метода се заснива на оксидацији фенол црвеног у присуству манган сулфата. Најпре је припремљен одговарајући сет разблажења комерцијалне манган пероксидазе у 0,25 M натријум лактатном пуферу (pH 4,5). Реакциона смеша је садржала 250 µL 0,25 M натријум лактатног пуфера (pH 4,5), 250 µL 0,25 M натријум сукцинатног пуфера (pH 4,5), 250 µL 0,5% (мас.) раствора желатина, 175 µL 0,71 mM раствора фенол црвеног, 100 µL 1,25 mM раствора манган сулфата и 125 µL раствора манган

пероксидазе. Упоредо је припремљен и контролни узорак који је уместо манган сулфата садржао 100  $\mu\text{L}$  дестиловане воде. Реакција је иницирана додавањем 100  $\mu\text{L}$  0,62 mM раствора водоник пероксида. Реакциона смеша је инкубирана на 30  $^{\circ}\text{C}$  током 5 min, након чега је реакција прекинута додавањем 50  $\mu\text{L}$  5 M натријум хидроксида. Промена апсорбанце је мерена на 610 nm, а ензимска активност ( $EA$ ) је израчуната према једначини:

$$EA (U mL^{-1}) = \frac{\Delta A \cdot V}{t \cdot \epsilon \cdot v \cdot d} \cdot R \quad (3.4)$$

где је  $\Delta A$  промена апсорбанце,  $V$  запремина реакционе смеше ( $mL$ ),  $t$  време инкубације ( $min$ ),  $\epsilon$  моларни апсорпциони коефицијент, који за фенол црвено износи  $22 L (mmol \cdot cm)^{-1}$ ,  $v$  запремина ензима ( $mL$ ),  $d$  дужина пређеног пута светлосног зрака ( $cm$ ), а  $R$  је разблажење ензима. Једна јединица манган пероксидазе ( $U$ ) представља количину ензима неопходну за катализовање оксидације 1  $\mu\text{mol}$  фенол црвеног за 1 min ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ).

Специфична ензимска активност ( $SEA$ ) манган пероксидазе изражена је као однос ензимске активности ( $EA$ ) и концентрације протеина ( $c_p$ ) и израчуната је према једначини:

$$SEA (U mg^{-1}) = \frac{EA}{c_p} \quad (3.5)$$

### 3.5.5.2. Одређивање концентрације протеина

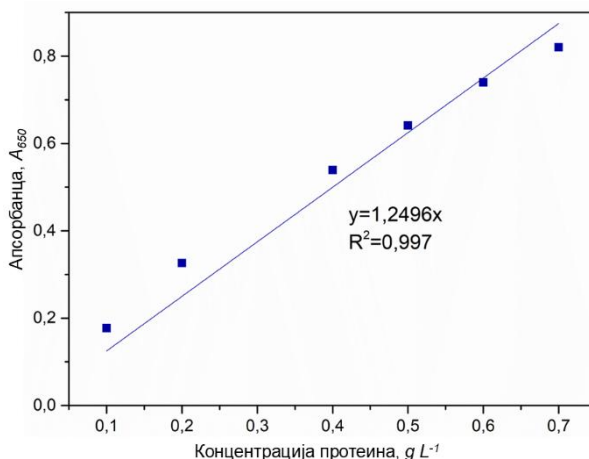
Како би се одредила специфична активност манган пероксидазе, неопходно је измерити концентрацију протеина у одговарајућем раствору ензима. Концентрација протеина одређивана је прилагођеном методом по Lowry-ју [295]. Најпре су припремљени реагенси:

Реагенс А: 0,2 g калијум натријум тартарата и 10 g натријум карбоната растворено је у 50 mL 1 N раствора натријум хидроксида и разблажено дестилованом водом до 100 mL;

Реагенс В: 2 g калијум натријум тартарата и 1 g бакар сулфат хидрата растворено је у 90 mL дестиловане воде, а затим допуњено 1 N раствором натријум хидроксида до 100 mL;

Реагенс С: 2 M Folin-Ciocalteu реагенс је помешан са дестилованом водом у запреминском односу 1:15.

Одмерено је 200  $\mu\text{L}$  раствора ензима и помешано са 180  $\mu\text{L}$  реагенса А. Реакциона смеша је инкубирана на 50  $^{\circ}\text{C}$  током 10 min. Након хлађења, у реакциону смешу је додато 20  $\mu\text{L}$  реагенса, након чега је уследила инкубација на собној температури током 10 min. Затим је у реакциону смешу додато 600  $\mu\text{L}$  реагенса, уз поновно инкубирање на 50  $^{\circ}\text{C}$  током 10 min. Након хлађења до собне температуре, измерена је апсорбанца на 650 nm у односу на слепу пробу, која је уместо раствора ензима садржала пуфер. Концентрација протеина присутних у раствору ензима прерачуната је на основу стандардне праве (слика 3.10.) добијене мерењем апсорбанци раствора албумина из говеђег серума ( $BSA$ , енгл. *bovine serum albumin*) познатих концентрација, у опсегу од 0,1  $g L^{-1}$  до 0,7  $g L^{-1}$ .



Слика 3.10. Стандардна права зависности концентрације протеина од апсорбанце мерене на 650 nm

Концентрација протеина ( $c_p$ ) израчуната је према једначини:

$$c_p \text{ (g L}^{-1}\text{)} = \frac{A_{650}}{1,2496} \cdot R \quad (3.6)$$

где је  $A_{650}$  апсорбанца измерена на 650 nm, а  $R$  фактор разблажења узорка.

### 3.6. Ензимска хидролиза биомасе

Како би се проценио утицај примењених третмана на повећање доступности угљенохидратне компоненте ензимима, третирана биомаса је хидролизована применом смеше ензима по измењеној методи описаној од стране Ху и сар. (2012) [296]. Осушени самлевени узорци (5% мас.) су помешани са 0,2 М цитратним пуфером (pH 4,8). Комерцијална смеша целулаза,  $\beta$ -глукозидаза и хемицелулаза (*Cellic Ctec 2*, Novozymes) је додата до коначне концентрације од 6 филтер папир јединица (енгл. *filter paper unit, FPU*) по граму биомасе. Као контролни узорак коришћена је нетретирана биомаса. Узорци су инкубирани на 50 °C током 48 h, уз мешање (150 rpm). У хидролизатима добијеним након центрифугирања (6 000 rpm, 10 min) одређена је концентрација пентоза и хексоза ослобођених током хидролизе. Додатно, хидролизати узорака у којима је остварен највиши степен делигнификације су анализирани применом течне хроматографије високих перформанси, према протоколу који ће касније бити детаљно описан (одељак 3.7.14.). На овај начин извршена је додатна процена погодности узорака за даљу валоризацију.

Након одабира најпогоднијих узорака за валоризацију кроз ферментационе процесе, испитана је могућност добијања што већих приноса ферментабилних шећера њиховом хидролизом. Одабране фракције третиране биомасе подвргнуте су ензимској хидролизи при претходно описаним условима, уз додатак комерцијалне смеше *Cellic Ctec 2*, при концентрацији од 6 FPU, односно 20 FPU по граму биомасе. У хидролизатима добијеним након 48 h одређен је концентрација редукујућих шећера методом са 3,5-динитросалицилном киселином.

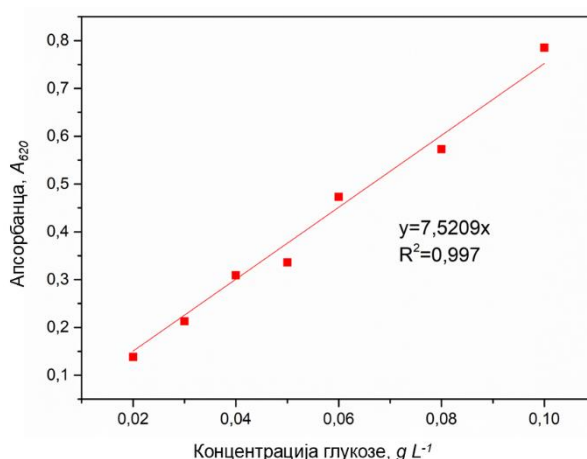
#### 3.6.1. Одређивање концентрације хексоза и пентоза

Концентрација хексоза и пентоза ослобођених током ензимске хидролизе третиране биомасе одређивана је спектрофотометријски. Концентрација хексоза у хидролизатима одређивана је применом стандардне методе са антроном [297]. Одмерено је 1 mL хидролизата (који садржи од 20  $\mu$ g до 200  $\mu$ g хексоза) и помешано са 2 mL 0,2% раствора антрона (у конц. сумпорној киселини). Смеша је промешана на вортексу и инкубирана у кључалом воденом купатилу током 5 min. Након хлађења је мерена апсорбанца на 620 nm у односу на слепу пробу, која је уместо хидролизата садржала 1 mL дестиловане воде. Како је ензимска хидролиза вршена смешом целулаза и хемицелулаза, ослобођене пентозе присутне у хидролизату могу да ометају читавање апсорбанце на 620 nm. Стога је измерена и апсорбанца на 670 nm, која потиче од пентоза и уврштена је у крајњу формулу. Концентрација хексоза присутних у хидролизату изражена је на глукозу и прерачуната је на основу стандардне праве (слика 3.11.) добијене мерењем апсорбанци раствора D-глукозе познатих концентрација, у опсегу од 0,02 g L<sup>-1</sup> до 0,1 g L<sup>-1</sup>.

Концентрација глукозе ( $c_{glu}$ ) израчуната је према једначини:

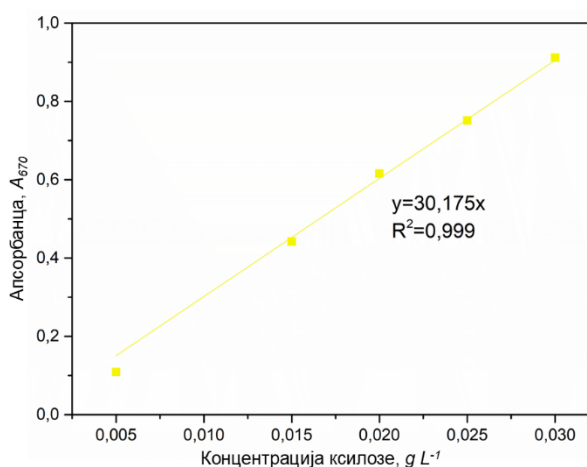
$$c_{glu} \text{ (g L}^{-1}\text{)} = \frac{A_{620} - A_{670}}{7,5209} \cdot R \quad (3.7)$$

где је  $A_{620}$  апсорбанца која потиче од хексоза, измерена на 620 nm,  $A_{670}$  апсорбанца која потиче од пентоза, измерена на 670 nm, а  $R$  је фактор разблажења узорка.



Слика 3.11. Стандардна права зависности концентрације глюкозе од разлике апсорбанци мерених на 620 и 670 nm

Концентрација пентоза у хидролизатима одређивана је применом стандардне методе са орцинолом [298]. Одмерено је 1 mL хидролизата (који садржи од 20  $\mu g$  до 200  $\mu g$  пентоза) и помешано са 134  $\mu L$  6% раствора орцинола (у 96% етанолу) и 2 mL 0,1% раствора  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (у конц. хлороводоничној киселини). Смеша је промешана на вортексу и инкубирана у кључалом воденом купатилу током 20 min. Након хлађења је измерена апсорбанца на 670 nm у односу на слепу пробу, која је уместо хидролизата садржала 1 mL воде. Концентрација пентоза присутних у хидролизату изражена је на ксилозу и прерачуната је на основу стандардне праве (слика 3.12) добијене мерењем апсорбанци раствора D-ксилозе познатих концентрација, у опсегу од 0,005  $g L^{-1}$  до 0,04  $g L^{-1}$ .



Слика 3.12. Стандардна права зависности концентрације ксилозе од апсорбанце мерене на 670 nm

Концентрација ксилозе ( $c_{xyl}$ ) израчуната је према једначини:

$$c_{xyl} (g L^{-1}) = \frac{A_{670}}{30,175} \cdot R \quad (3.8)$$

где је  $A_{670}$  апсорбанца измерена на 670 nm, а  $R$  фактор разблажења узорка.

### 3.6.2. Одређивање концентрације редукујућих шећера

Концентрација редукујућих шећера у хидролизатима одређивана је стандардном спектрофотометријском методом са 3,5-динитросалицилном киселином [299]. Метода се заснива на одређивању присуства слободне карбонилне групе ( $C=O$ ) код редукујућих шећера. Алдехидна функционална група (код глюкозе), односно кето функционална група (код фруктозе) се у присуству 3,5-динитросалицилне киселине оксидује до карбонилне групе, при

чему се 3,5-динитросалицилна киселина редукује до 3-амино-5-нитросалицилне киселине карактеристичног црвено-браон обојења. Интензитет обојења пропорционалан је концентрацији присутне глукозе и одређује се на таласној дужини од 505 nm.

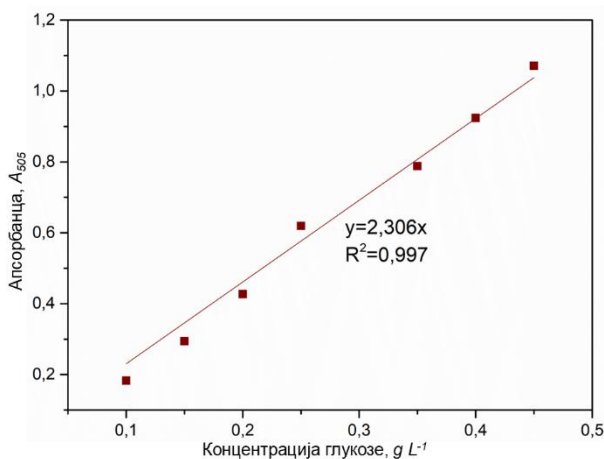
Најпре је припремљен 1% раствор 3,5-динитросалицилне киселине, који је садржао 10 g L<sup>-1</sup> 3,5-динитросалицилне киселине, 0,5 g L<sup>-1</sup> натријум сулфита и 10 g L<sup>-1</sup> натријум хидроксида. Упоредо је припремљен и 40% раствор калијум-натријум тартарата.

Одмерено је 1 mL хидролизата и пренето је у епрувету, а затим је додато и 1 mL раствора 3,5-динитросалицилне киселине. Епрувете су затворене, садржај је промешан на вортексу и инкубиране у воденом купатилу на 90 °C, у трајању од 15 min. Након инкубирања, у топао раствор је додато 333 μL раствора калијум-натријум-тартарата. Након хлађења је измерена апсорбанца на 505 nm у односу на слепу пробу, која је уместо хидролизата садржала 1 mL воде. Концентрација редукујућих шећера присутних у хидролизату изражена је на глукозу и прерачуната је на основу стандардне праве (слика 3.13.) добијене мерењем апсорбанци раствора D-глукозе познатих концентрација, у опсегу од 0,1 g L<sup>-1</sup> до 0,5 g L<sup>-1</sup>.

Концентрација редукујућих шећера ( $c_{red}$ ), изражена на глукозу, израчуната је према једначини:

$$c_{red} (g L^{-1}) = \frac{A_{505}}{2,306} \cdot R \quad (3.9)$$

где је  $A_{505}$  апсорбанца испитиваног раствора мерена на 505 nm, а  $R$  је фактор разблажења.

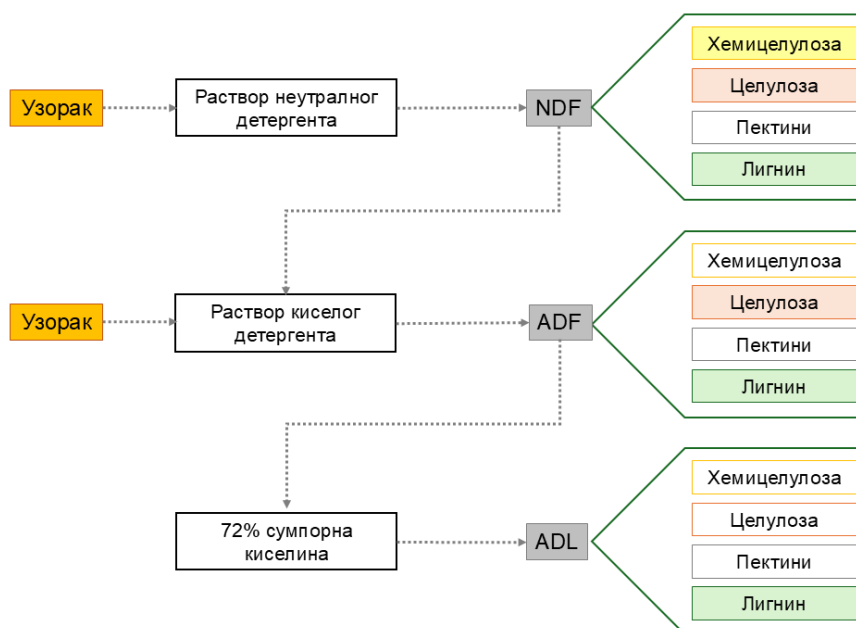


Слика 3.13. Стандардна права зависности концентрације глукозе од апсорбанце мерене на 505 nm

### 3.7. Карактеризација биомасе

#### 3.7.1. Одређивање садржаја влакана

Одређивање садржаја влакана у сировој кукурузној стабљивици вршено је методом коју су предложили Van Soest и сар. (1970) [300], прилагођеном за извођење на уређају Behrotest<sup>®</sup> CF 2+2. Метода се заснива на сукцесивном разлагању фракција влакана до лигнина. Схематски приказ ове методе представљен је на слици 3.14.



Слика 3.14. Схематски приказ одређивања садржаја влакана методом по Van Soest-у [301]

За одређивање садржаја влакана коришћена је биомаса припремљена на начин описан у одељку 3.2. Најпре су припремљени раствори неутралног и киселог детергента.

Раствор неутралног детергента:

- 30 g натријум додецил сулфата
- 18,61 g динатријум етилен диамин тетра-ацетата (EDTA)
- 6,81 g натријум борат декахидрата
- 4,56 g динатријумхидроген фосфата
- 10 mL 2-етоксиетанола
- дестилована вода до 1 L.

У одмерен EDTA и натријум борат додато је око 200 mL дестиловане воде и загревано док се компоненте не растворе. У око 300 mL дестиловане воде растворени су натријум додецил сулфат и 2-етоксиетанол. Одмерена маса динатријум хидроген фосфата растворена је у мало воде, а затим су сви припремљени раствори помешани и додата је дестилована вода до 1 L. Уколико је потребно, рН вредност раствора детергента је подешена на 6,9-7,1 помоћу раствора хлороводоничне киселине или натријум хидроксида.

Раствор киселог детергента:

- 1 L 1 N раствора сумпорне киселине (одмерено 49,04 g конц. сумпорне киселине, допуњено дестилованом водом до 1 L)
- 20 g цетил триметиламонијум бромид (растворен у 1 L припремљеног раствора сумпорне киселине, уз мешање)

*Влакна нерастворљива у неутралним детергентима – неутрална детергентска влакна*

Влакна нерастворљива у неутралним детергентима или неутрална детергентска влакна (енгл. *Neutral Detergent Fibers, NDF*) чине компоненте ћелијског зида, хемицелулоза, целулоза и лигнин. Третирањем биомасе раствором неутралног детергента долази до хидролизе растворљивих пектина, протеина, шећера и масти, док преостали неразградиви део чине NDF и нерастворне минералне материје. Жарењем третиране биомасе одређује се садржај пепела, а на основу разлике масе пре и после жарења добија се садржај NDF.

Реагенси: натријум сулфит, декалин, ацетон, раствор неутралног детергента

## Поступак:

У гуч са филтером од синтерованог стакла је одмерено 1 g сирове биомасе са тачношћу  $\pm 0,001$  g ( $m_1$ ), а затим је додато 0,5 g натријум сулфита, како би се поспешило разлагање протеина. Гуч је постављен на колону за хидролизу, након чега је додато 100 mL загрејаног раствора неутралног детергента и 2 mL декалина. Декалин је додат како би се контролисао настанак пене. Смеша у колони је постепено загревана до тачке кључања, а затим је загревање настављено наредних 60 min. Након тога, раствор је уклоњен вакуум филтрацијом, а заостала биомаса је испрана најпре топлом дестилованом водом, а затим и ацетоном. Биомаса је затим сушена у сушници на 105 °C до постизања константне масе. Након хлађења у ексикатору, измерена је маса гуча са тачношћу  $\pm 0,001$  g ( $m_2$ ). Гучеви са биомасом су чувани у ексикатору до следећег корака.

*Влакна нерастворљива у киселим детергентима – кисела детергентска влакна*

Влакна нерастворљива у киселим детергентима или кисела детергентска влакна (енгл. *Acid Detergent Fibers, ADF*) се састоје од целулозе и лигнина. Садржај ADF у сировој биомаси се може одредити директно, третирањем биомасе раствором киселог детергента, или консекутивно, третирањем осушене фракције биомасе која заостаје након третмана раствором неутралног детергента.

Реагенси: раствор киселог детергента, декалин, ацетон

## Поступак:

Гучеви са биомасом која је претходно третирана раствором неутралног детергента су постављени на колону за хидролизу. У колоне је додато по 100 mL загрејаног раствора киселог детергента и 2 mL декалина. Смеша у колони је постепено загревана до тачке кључања, а затим је загревање настављено наредних 60 min. Након тога, раствор је уклоњен вакуум филтрацијом, а заостала биомаса је испрана најпре топлом дестилованом водом, а затим и ацетоном. Биомаса је затим сушена у сушници на 105 °C до постизања константне масе. Након хлађења у ексикатору, измерена је маса гуча са тачношћу  $\pm 0,001$  g ( $m_2$ ). Гучеви са биомасом су чувани у ексикатору до следећег корака.

*Лигнин нерастворљив у киселим детергентима*

У циљу одређивања садржаја лигнина нерастворљивог у киселим детергентима (енгл. *Acid Detergent Lignin, ADL*) неопходно је најпре хидролизом одстранити растворљиве протеине, скроб, масти и шећере. Садржај ADL-а у биомаси се може одредити или третирањем биомасе раствором киселог детергента и сумпорном киселином или третирањем осушене фракције биомасе која заостаје након третмана раствором сумпорне киселине.

Реагенси: 72% раствор сумпорне киселине

## Поступак:

Након хлађења у ексикатору, у сваки гуч са биомасом претходно третираном раствором киселог детергента је додато 72% сумпорна киселина тако да сва биомаса буде потопљена. Гучеви са биомасом су остављени на собној температури током 3 h, уз повремено мешање стакленим штапићем, како би се разградио лигнин растворљив у сумпорној киселини. Биомаса је потом испрана дестилованом водом, гучеви су пренети у Петри шоље, а затим сушени у сушници на 105 °C до постизања константне масе. Након хлађења у ексикатору, измерена је маса гуча са тачношћу  $\pm 0,001$  g ( $m_2$ ). Гучеви са осушеном биомасом су постављени у пећ на жарење на 500 °C у трајању од најмање 3 h. Након жарења, гучеви су хлађени у ексикатору, а затим измерени са тачношћу  $\pm 0,001$  g ( $m_3$ ).

Садржаји неутралних детергентских влакана (*NDF*), киселих детергентских влакана (*ADF*), као и садржај лигнин нерастворљивог у киселим детергентима (*ADL*), изражени у процентима, рачунати су применом следећих једначина:

$$NDF (\%) = \frac{m_{2,NDF} - m_3}{m_1} \cdot 100 \quad (3.10)$$

$$ADF (\%) = \frac{m_{2,ADF} - m_3}{m_1} \cdot 100 \quad (3.11)$$

$$ADL (\%) = \frac{m_{2,ADL} - m_3}{m_1} \cdot 100 \quad (3.12)$$

где је  $m_1$  маса сирове биомасе коришћене за одређивање садржаја влакана ( $g$ ),  $m_{2,NDF}$ ,  $m_{2,ADF}$  и  $m_{2,ADL}$  масе гуча са биомасом третираном неутралним детергентом, киселим детергентом, односно сумпорном киселином, након сушења, респективно ( $g$ ), а  $m_3$  маса гуча са биомасом након жарења ( $g$ ).

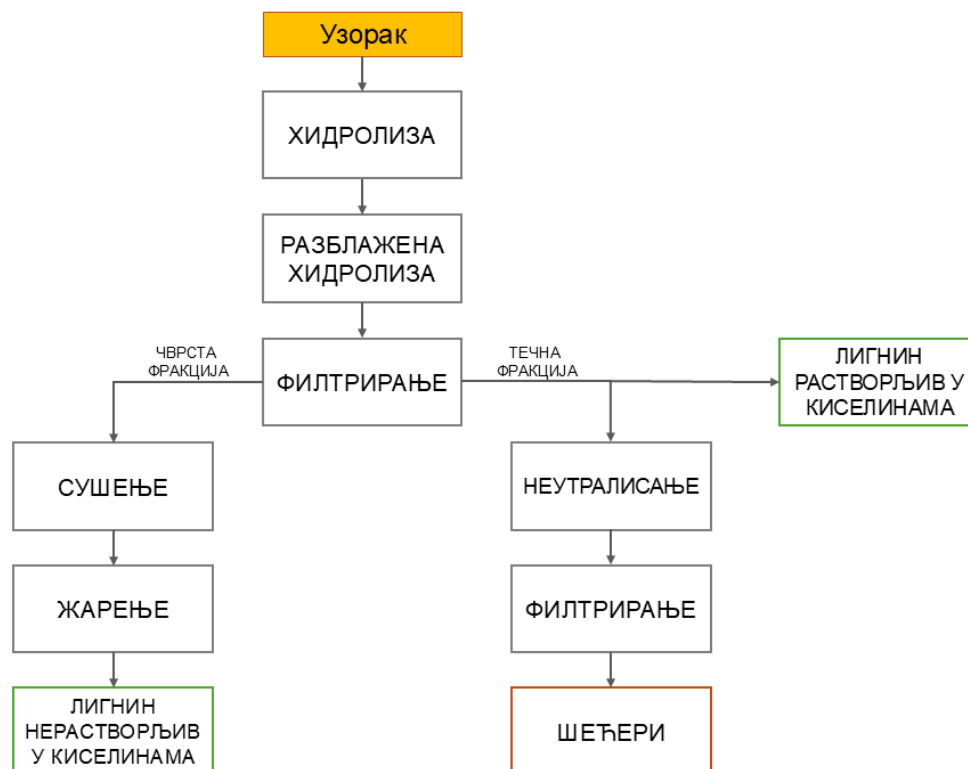
Садржај целулозе и хемицелулозе израчунат је применом следећих једначина:

$$\text{Целулоза (\%)} = ADF - ADL \quad (3.13)$$

$$\text{Хемицелулоза (\%)} = NDF - ADF \quad (3.14)$$

### 3.7.2. Одређивање садржаја структурних угљених хидрата и лигнина

Садржај структурних угљених хидрата (целулозе и хемицелулозе) и лигнина у сировој и третираној биомаси одређиван је применом протокола развијеног од стране Националне лабораторије за обновљиву енергију САД-а (енгл. *National Renewable Energy Laboratory; NREL*) [302]. Протокол се заснива на хидролизи целулозе и хемицелулозе до простих шећера и одређивања њиховог садржаја применом течне хроматографије високих перформанси (енгл. *High-performance Liquid Chromatography, HPLC*). Вредност која се користи за процену садржаја структурних угљених хидрата добија се на основу концентрације глукозе и ксилозе добијених након хидролизе и одређених HPLC анализом. Садржај лигнина је одређиван гравиметријски у случају лигнина нерастворљивог у киселинама, односно спектрофотометријски у случају лигнина растворљивог у киселинама. Схематски приказ протокола представљен је на слици 3.15.



Слика 3.15. Схематски приказ протокола за одређивање садржаја структурних угљених хидрата и лигнина

### Припрема гучева

Одговарајући број гучева са филтером од синтерованог стакла је постављено у пећ за жарење до константне масе на  $575\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  у трајању од најмање 4 h. Након жарења, гучеви су хлађени у ексикатору најмање 1 h. Након хлађења, измерене су масе гучева са тачношћу од  $\pm 0,1\text{ mg}$ .

### Припрема стандарда шећера

Упоредо са узорцима, на хидролизу разблаженом киселином постављени су и одговарајући сетови стандардних раствора шећера (енгл. *Sugar Recovery Standards, SRS*) како би се узели у обзир и губици шећера који потичу од саме хидролизе. Припремљени стандарди се састоје од смеше стандардних раствора D-(+)-глюкозе, D-(+)-ксилозе, D-(+)-галактозе, L-(+)-арабинозе и D-(+)-манозе. Концентрације шећера у стандардним растворима одабране су тако да буду налик концентрацији поменутих шећера у испитиваној биомаси, у опсегу од 1 до  $4\text{ mg mL}^{-1}$ . Након одмеравања одговарајућих маса шећера, са тачношћу  $\pm 0,1\text{ mg}$ , додато је  $10\text{ mL}$  воде и  $348\text{ }\mu\text{L}$  72% сумпорне киселине. Раствори су помешани и заједно са узорцима постављени на хидролизу у аутоклаву.

### Хидролиза узорака

Одмерено је  $300,0\text{ mg} \pm 10,0\text{ mg}$  узорка и пренето у реагенс боцу од  $100\text{ mL}$ . Додато је  $3,00\text{ mL} \pm 0,01\text{ mL}$  72% сумпорне киселине у сваку реагенс боцу. Узорци су добро измешани стакленим штапићем (око 1 min) и постављени на инкубацију у воденом купатилу на  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  током 60 min. На сваких 5 до 10 min узорци су измешани стакленим штапићем, без вађења узорака из воденог купатила. Након инкубације, узорци су разблажени до концентрације киселине од 4% додавањем  $84,00\text{ mL} \pm 0,04\text{ mL}$  дестиловане воде. Узорци су измешани превртањем боца неколико пута, како би се фазе са различитим концентрацијама киселина добро измешале. Измешани узорци су постављени на хидролизу у аутоклав на  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  током 60 min. Након завршене хидролизе, узорци су хлађени до собне температуре. Охлађени узорци су филтрирани кроз гучеве вакуум филтрацијом. Одвојено је  $50\text{ mL}$  аликвота сваког узорка и пренето у кивете. Овако добијени хидролизати коришћени су за одређивање садржаја шећера и лигнина растворљивог у киселинама.

### Одређивање садржаја лигнина

За одређивање садржаја лигнина нерастворљивог у киселинама коришћена је чврста фракција након филтрације. Квантитативно је пребачена сва заостала биомаса у гучеве испирањем боца дестилованом водом (око  $50\text{ mL}$  воде по узорку). Гучеви су сушени у сушници на  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  најмање 4 h. Након хлађења у ексикатору од минимум 1 h, гучеви са осушеним узорцима су измерени са тачношћу  $\pm 0,1\text{ mg}$ . Након тога, гучеви су постављени на жарење до константне масе консекутивно. Пећ је најпре загрејана на  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  и гучеви су инкубирани на овој температури током 12 min. Затим је уследило догревање до  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  током 30 min, након чега су гучеви жарени на  $575\text{ }^{\circ}\text{C}$  у трајању од 180 min. Ижарени гучеви су се постепено хладили до  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  и одржавани су на тој температури до вађења из пећи. Након хлађења у ексикатору од најмање 1 h, гучеви су измерени са тачношћу  $\pm 0,1\text{ mg}$ . Садржај остатка нерастворљивог у киселинама (енгл. *Acid Insoluble Residue, AIR*) и лигнина нерастворљивог у киселинама (енгл. *Acid Insoluble Lignin, AIL*) израчунати су према следећим једначинама:

$$AIR (\%) = \frac{m_{\text{nakon sušenja}} - m_{\text{praznog guča}}}{m_{\text{uzorka}}} \cdot 100 \quad (3.15)$$

где је  $m_{\text{nakon sušenja}}$  маса гуча са узорком након сушења на  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $m_{\text{praznog guča}}$  маса празног гуча, а  $m_{\text{uzorka}}$  маса узорка која је коришћена за хидролизу,

$$AIL (\%) = \frac{(m_{\text{nakon sušenja}} - m_{\text{praznog guča}}) - (m_{\text{nakon žarenja}} - m_{\text{praznog guča}}) - m_{\text{proteina}}}{m_{\text{uzorka}}} \cdot 100 \quad (3.16)$$

где је  $m_{\text{nakon sušenja}}$  маса гуча са узорком након сушења на  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $m_{\text{nakon žarenja}}$  маса гуча са пепелом након жарења на  $575\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $m_{\text{praznog guča}}$  маса празног гуча, а  $m_{\text{uzorka}}$  маса узорка која је коришћена за хидролизу.

За одређивање садржаја лигнина растворљивог у киселинама коришћена је течна фракција добијена након филтрације. Садржај лигнина растворљивог у киселинама неопходно је одредити у року од 6 h након извршене хидролизе. Измерена је апсорбанца филтрата добијеног након хидролизе узорака на  $320\text{ nm}$  у односу на 4% сумпорну киселину као слепу пробу. Садржај лигнина растворљивог у киселинама (енгл. *Acid Soluble Lignin, ASL*) израчунат је према следећој једначини:

$$ASL (\%) = \frac{A_{320} \cdot V_{\text{filtrata}} \cdot R}{\varepsilon \cdot m_{\text{uzorka}} \cdot l} \cdot 100 \quad (3.17)$$

где је  $A_{320}$  апсорбанца узорка измерена на  $320\text{ nm}$ ,  $V_{\text{filtrata}}$  запремина филтрата ( $86,73\text{ mL}$ ),  $R$  разблажење,  $\varepsilon$  апсорпциони коефицијент ( $\varepsilon=30\text{ L g}^{-1}\text{ cm}$  за кукурузну стабљику),  $m_{\text{uzorka}}$  маса узорка која је коришћена за хидролизу ( $\text{mg}$ ), а  $l$  дужина пређеног пута светлосног зрака кроз кивету ( $\text{cm}$ ).

Укупан садржај лигнина у испитиваном узорку израчунат је према једначини:

$$\text{Лигнин (\%)} = AIL(\%) + ASL(\%) \quad (3.18)$$

где је  $AIL$  садржај лигнина нерастворљивог у киселинама, а  $ASL$  садржај лигнина растворљивог у киселинама.

#### Одређивање садржаја шећера

За одређивање садржаја шећера коришћена је течна фракција добијена након филтрације. Око  $20\text{ mL}$  хидролизата је пренето у ерленмајере од  $50\text{ mL}$ . Узорци су неутралисани до рН 5-6 помоћу калцијум карбоната, избегавајући да рН пређе 6. Промена рН је праћена помоћу рН индикаторских папира. Након достизања рН 4 постепено је додаван калцијум карбонат, како би се избегла експлозивна реакција. Узорци су повремено мешани. Након достизања рН 5-6, узорци су остављени да се исталоже и супернатанти су одвојени декантовањем. рН вредност овако добијених супернатаната би требало да буде око 7. Неутралисани супернатанти су припремљени за HPLC филтрирањем кроз  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  филтер.

Садржај шећера израчунат је према једначини:

$$\% \text{ Шећера} = \frac{C_{\text{anhidro}} \cdot V_{\text{filtrata}} \cdot \frac{1\text{ g}}{1000\text{ mg}}}{m_{\text{uzorka}}} \cdot 100 \quad (3.19)$$

где је  $V_{\text{filtrata}}$  запремина филтрата ( $86,37\text{ mL}$ ), а  $C_{\text{anhidro}}$  концентрација шећера након хидролизе, коригована корелационим фактором конверзије,  $Anh$  ( $0,88$  за пентозе, односно  $0,90$  за хексозе) и рекуперацијом шећера након хидролизе,  $R_{\text{šećera}}$ .

Концентрација шећера након хидролизе израчуната је према једначини 3.20, а рекуперација шећера након хидролизе према једначини 3.21:

$$C_{\text{anhidro}} (\text{mg mL}^{-1}) = \frac{C_{\text{HPLC}} \cdot \text{faktor razbl.}}{\%R_{\text{šećera}}/100} \cdot Anh \quad (3.20)$$

$$R_{\text{šećera}} (\%) = \frac{\text{konc. šećera detektovana na HPLC-u, mg mL}^{-1}}{\text{konc. šećera u SRS pre hidrolize, mg mL}^{-1}} \quad (3.21)$$

Конкретно, садржај целулозе израчунат је према једначини 3.22, а садржај хемицелулозе према једначини 3.23:

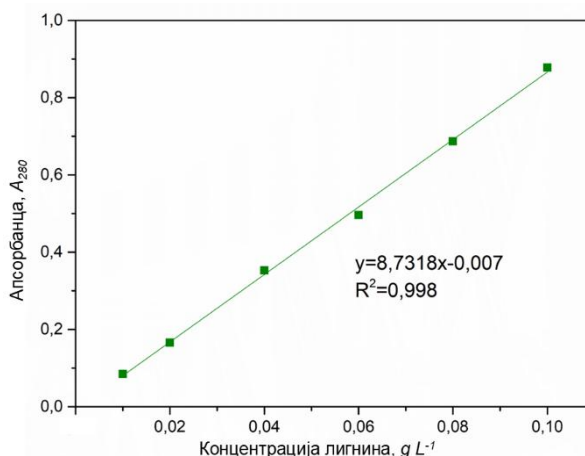
$$\text{Целулоза (\%)} = \frac{C_{\text{HPLC,glukoza}} \cdot \text{faktor razbl.} \cdot 0,9 \cdot 100 \cdot V_{\text{filtrata}} \cdot \frac{1\text{ g}}{1000\text{ mg}}}{\%R_{\text{šećera}} \cdot m_{\text{uzorka}}} \cdot 100 \quad (3.22)$$

$$\text{Хемицелулоза (\%)} = \frac{C_{\text{HPLC,ksiloza}} \cdot \text{faktor razbl.} \cdot 0,88 \cdot 100 \cdot V_{\text{filtrata}} \cdot \frac{1\text{ g}}{1000\text{ mg}}}{\%R_{\text{šećera}} \cdot m_{\text{uzorka}}} \cdot 100 \quad (3.23)$$

### 3.7.3. Одређивање садржаја лигнина растворљивог у ацетил бромиду

Садржај лигнина у сировој и резидуалног лигнина у третираној биомаси одређиван је према методи коју су развили Fukushima и Hatfield (2001) [303], прилагођеној за рад у мањим запреминама. Метода се заснива на растворљивости лигнина у ацетил бромиду. У стаклене бочице са чепом је одмерено 5 mg самлевене биомасе и преливено са 500  $\mu\text{L}$  свеже припремљеног 25% (v/v) раствора ацетил бромида у глацијалној сирћетној киселини. Упоредо је припремљена слепа проба која је садржала ацетил бромид, али не и биомасу. Дигестија узорка и слепа пробе одвијала се на 50  $^{\circ}\text{C}$  током 2 h, уз мешање (150 rpm). Након тога, узорци су центрифугирани (12 000 rpm, 10 min). Одмерено је 100  $\mu\text{L}$  супернатанта, пренето у нови епендорф, а затим додато 400  $\mu\text{L}$  0,3 M раствора натријум хидроксида и 200  $\mu\text{L}$  свеже припремљеног 0,5 M раствора хидроксиламин хидрохлорида. Смеша је снажно промешана на вортексу, а затим разблажена глацијалном сирћетном киселином до 2 mL (додавањем 1,3 mL киселине). Садржај у епендорфу је измешан превртањем неколико пута, у микротитарску плочу је пренето по 200  $\mu\text{L}$  и измерена је апсорбанца на 280 nm у односу на слепу пробу. Слепа проба је припремљена мешањем дигестованог раствора ацетил бромида, натријум хидроксида, хидроксиламин хидрохлорида и глацијалне сирћетне киселине у истом односу као у узорцима. Уколико је потребно, узорци су накнадно разблажени глацијалном сирћетном киселином. За фактор разблажења узето је у обзир укупно разблажење дигестованог узорка.

Концентрација лигнина растворљивог у ацетил бромиду (енгл. *acetyl bromide soluble lignin*, *ABSL*) одређивана је из стандардне праве (слика 3.16.), добијене мерењем апсорбанци раствора крафт лигнина познатих концентрација, у опсегу од 0,01  $\text{g L}^{-1}$  до 0,2  $\text{g L}^{-1}$ . Концентрација лигнина је даље коришћена за израчунавање садржаја лигнина.



Слика 3.16. Стандардна права зависности концентрације лигнина од апсорбанце мерене на 280 nm

Садржај лигнина растворљивог у ацетил бромиду (*ABSL*) израчунат је применом једначине:

$$ABSL (\%) = (0,11452 \cdot A_{280} + 0,0008) \cdot 10 \cdot \frac{R}{m} \cdot 100 \quad (3.24)$$

где је  $A_{280}$  апсорбанца испитиваног узорка измерена на 280 nm,  $R$  фактор разблажења узорка, а  $m$  је маса одмерене биомасе ( $\text{mg}$ ).

Степен делигнификације третиране биомасе представља однос лигнина присутног у сировој биомаси и резидуалног лигнина у третираној биомаси и израчунат је применом једначине:

$$\text{Степен делигнификације } (\%) = \left(1 - \frac{ABSL_{TB}}{ABSL_{SB}}\right) \cdot 100 \quad (3.25)$$

где је  $ABSL_{TB}$  садржај лигнина растворљивог у ацетил бромиду у третираној биомаси, а  $ABSL_{SB}$  садржај лигнина растворљивог у ацетил бромиду у сировој биомаси.

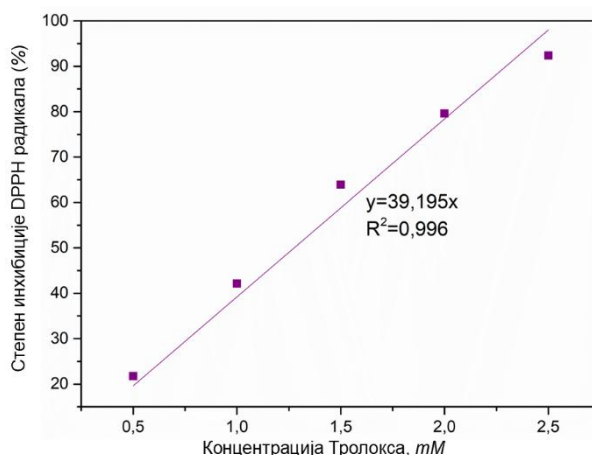
### 3.7.4. Одређивање антиоксидативне активности лигнинске фракције

Антиоксидативна активност лигнинских фракција изолованих након третмана одређивана је применом стандардне спектрофотометријске методе базиране на инхибицији комерцијалних радикала – DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал) [304] и ABTS (2,2'-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат)) [305]. У ову сврху припремљени су екстракти лигнинских фракција у диметил-сулфоксиду ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ).

Испитивање антиоксидативне активности инхибицијом DPPH радикала заснива се на способности овог стабилног азотног радикала да се у реакцији са дономом протона редукује до DPPH-H, при чему долази до промене боје из љубичасте у жуту. Интензитет промене боје одређује се спектрофотометријски на  $517 \text{ nm}$ . За одређивање антиоксидативне активности узорака, најпре је припремљен  $0,15 \text{ mM}$  раствор DPPH у метанолу. Припремљени раствор чуван је у тамној боци како би се спречила редукција под утицајем светлости. Затим је у епендорф пренето  $50 \mu\text{L}$  узорка и  $1\ 950 \mu\text{L}$  раствора DPPH у метанолу ( $A_s$ ). Као контролни, тзв. *blank* узорак ( $A_b$ ) коришћен је чист растварач. Као контрола је припремљена смеша од  $50 \mu\text{L}$  растварача и  $1\ 950 \mu\text{L}$  раствора DPPH ( $A_c$ ). Садржај у епендорфима је промешан на вортексу, а затим остављен да стоји на собној температури на тамном месту. Након  $30 \text{ min}$ , по  $200 \mu\text{L}$  претходно промешаних узорака на вортексу пренето је у микротитарску плочу и очитане су апсорбанце на таласној дужини  $517 \text{ nm}$ . Процент инхибиције DPPH радикала израчунат је према једначини:

$$DPPH (\%) = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c}\right) \cdot 100 \quad (3.26)$$

где је  $A_s$  измерена апсорбанца узорка,  $A_b$  измерена апсорбанца растварача без DPPH, тзв. *blank* и  $A_c$  је измерена апсорбанца контроле. Добијени степен инхибиције се може изразити и као еквивалент стандардног антиоксиданса – Тролокса (слика 3.17).



Слика 3.17. Зависност степена инхибиције DPPH радикала од концентрације Тролокса

Степен инхибиције DPPH радикала изражен као еквивалент Тролокса ( $DPPH_{eT}$ ) израчунат је према једначини:

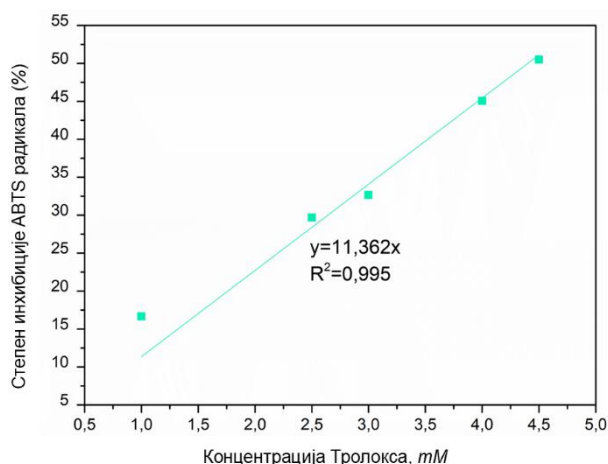
$$DPPH_{eT} (\text{mM mL}^{-1}) = \frac{DPPH(\%)}{39,195} \quad (3.27)$$

Одређивање антиоксидативне активности методом редукције ABTS радикала заснива се на способности антиоксидативних молекула да неутралишу стабилне бисрадикал катјоне  $ABTS^{+}$ , при чему се формира комплекс хромофора карактеристичног плаво-зеленог обојења, апсорпционог максимума на  $734 \text{ nm}$ . Радикални катјон ABTS ( $ABTS^{+}$ ) настаје као производ реакције између  $7 \text{ mM}$  раствора ABTS и  $245 \text{ mM}$  раствора амонијум-персулфата. Реагенс је припремљен мешањем  $10 \text{ mL}$  раствора ABTS са  $101 \mu\text{L}$  раствора амонијум-персулфата. Реакциона смеша је чувана у мраку на собној температури  $12 \text{ h}$  до  $16 \text{ h}$  пре употребе, како би се реакција одиграла у потпуности. Овако добијена реакциона смеша је чувана у фрижидеру.

Свеж раствор  $ABTS^{*+}$  припреман је непосредно пред употребу, разблаживањем дестилованом водом до апсорбанце  $0,700 \pm 0,05$  на таласној дужини од 734 nm. Одмерено је 2 000  $\mu\text{L}$  раствора  $ABTS^{*+}$  и помешано са 10  $\mu\text{L}$  узорка ( $A_s$ ). Као контролни, тзв. *blank* узорак ( $A_b$ ) коришћен је чист растварач. Као контрола је припремљена смеша од 10  $\mu\text{L}$  растварача и 2 000  $\mu\text{L}$  раствора  $ABTS^{*+}$  ( $A_c$ ). Садржај у епандорфима је промешан на вортексу, а затим остављен на тамном месту током 5 min како би се реакција одиграла. Након тога, по 200  $\mu\text{L}$  претходно промешаних узорка на вортексу пренето је у микротитарску плочу и очитане су апсорбанце на таласној дужини 734 nm. Процент инхибиције  $ABTS$  радикала израчунат је према једначини:

$$ABTS (\%) = 100 \times \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c}\right) \quad (3.28)$$

где  $A_s$  представља апсорбанцу узорка у присуству  $ABTS$ ,  $A_b$  је апсорбанца растварача без  $ABTS$ , тзв. *blank*, и  $A_c$  је апсорбанца раствора контроле са  $ABTS$ . Добијени степен инхибиције се може изразити и као еквивалент стандардног антиоксиданса – Тролокса (слика 3.18.).



Слика 3.18. Зависност степена инхибиције  $ABTS$  радикала од концентрације Тролокса

Степен инхибиције  $ABTS$  радикала изражен као еквивалент Тролокса израчунат је према једначини:

$$ABTS_{eT} (mM mL^{-1}) = \frac{ABTS(\%)}{11,362} \quad (3.29)$$

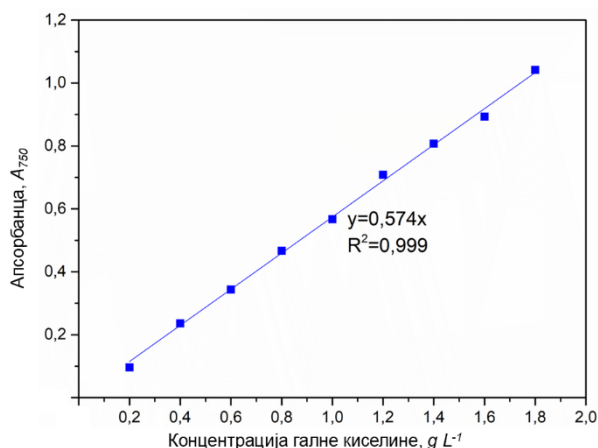
### 3.7.5. Одређивање концентрације укупних полифенола у лигнинској фракцији

Концентрација укупних полифенола (енгл. *Total polyphenolic content, TPC*) одређивана је у истим екстрактима лигнинске фракције у диметил-сулфоксиду ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) који су коришћени за испитивање антиоксидативне активности. За одређивање концентрације укупних полифенола коришћена је стандардна спектрофотометријска метода са Folin-Ciocalteu реагенсом [306]. Одмерено је 0,5 mL узорка и помешано је са 2,5 mL Folin-Ciocalteu реагенса и 5 mL 20% раствора натријум карбоната, након чега је додата дестилована вода до 50 mL. Узорци су затим инкубирани у воденом купатилу на  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  током 30 min. Након тога, по 200  $\mu\text{L}$  претходно промешаних узорка на вортексу пренето је у микротитарску плочу и очитане су апсорбанце на таласној дужини од 750 nm. За израчунавање концентрације укупних полифенола коришћена је стандардна права (слика 3.19.), добијена мерењем апсорбанци раствора галне киселине познатих концентрација, у опсегу од  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  до  $2,0 \text{ g L}^{-1}$ .

Концентрација укупних полифенола изражена је као еквивалент галне киселине (енгл. *Galllic acid equivalent, GAE*) и израчунат је према једначини:

$$GAE (g L^{-1}) = \frac{A_{750}}{0,574} \quad (3.30)$$

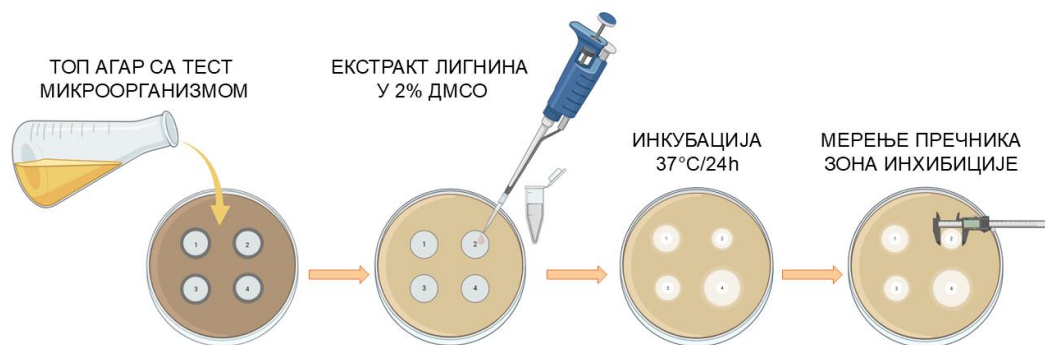
где је  $A_{750}$  апсорбанца измерена на 750 nm.



Слика 3.19. Зависност концентрације галне киселине од апсорбанце измерене на 750 nm

### 3.7.6. Одређивање антимицробне активности лигнинске фракције

Антимицробна активност изоловане лигнинске фракције на раст *B. cereus*, *C. albicans*, *E. coli* и *S. aureus* испитивана је агар-дифузионом методом [307]. Екстракти лигнина у чистом диметил-сулфоксиду ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) су најпре разблажени водом до коначне концентрације диметил-сулфооксида од 2%, како би се спречила инхибиција растварачем [308]. Разблажени екстракти су стерилисани филтрирањем кроз  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$  филтере. Одабране културе су активирани пресејавањем у одговарајуће хранљиве подлоге – сладни бујон за *C. albicans* и хранљиви бујон за *B. cereus*, *E. coli* и *S. aureus*. У Петри шоље је нанет слој одговарајућег агара, сладног или хранљивог, у зависности од коришћеног микроорганизама. Након очвршћавања, на агар су асептично постављани керамички бунарчићи, пречника  $5 \text{ mm}$ . Затим је око бунарчића нанет слој растопљеног топ агара (сладног или хранљивог), који је претходно инокулисан преконоћном патогеном културом одабраном за испитивање антимицробне активности. Бунарчићи су пажљиво уклоњени након очвршћавања топ агара. У отворе је затим додато по  $100 \text{ }\mu\text{L}$  раствора различитих екстраката лигнина и 2% раствора диметил-сулфооксида, како би се испитао потенцијални инхибиторни утицај растварача на раст патогених микроорганизама. Такође, испитан је и утицај одговарајућих антибиотика, односно антимицотика, применом папирних дискова са жељеном тест супстанцом – нистатином, стрептомицином и канамицином. Петри шоље су инкубирани у статичним условима на  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  преко ноћи. Уколико је дошло до инхибиције раста микроорганизама, око отвора са растворима лигнина су уочене бистре, светлије зоне које се називају зоне инхибиције. Мерењем пречника ових зона процењена је антимицробна активност лигнинских фракција према патогеним микроорганизмима. Схематски приказ ове методе приказан је на слици 3.20.



Слика 3.20. Схематски приказ агар-дифузионе методе за одређивање антимицробне активности лигнинских фракција

### 3.7.7. Одређивање садржаја укупних и испарљивих чврстих материја

Садржај укупних и испарљивих чврстих материја одређен је гравиметријски у сировој биомаси и третираним узорцима који су одабрани за валоризацију кроз анаеробну дигестију, као и у инокулуму који је коришћен у процесу анаеробне дигестије [309]. Укупне чврсте материје (енгл. *Total solids, TS*) се односе и на органска и неорганска једињења, а испарљиве материје само на органска једињења (енгл. *Volatile solids, VS*). Око 1 g узорка је одмерен у гучи и сушен у сушници на 105°C преко ноћи (око 20 h), до постизања константне масе. Након сушења, узорци су охлађени у ексикатору и измерена им је маса са тачношћу ±0,1 mg. Узорци су затим постављени на жарење на 550 °C током 3 h. Након хлађења у ексикатору, измерена је маса ижарених узорака са тачношћу ±0,1 mg. Садржаји укупних (*TS*) и испарљивих чврстих материја (*VS*), пепела и воде израчунати су према једначинама:

$$TS (\%) = \frac{m_{\text{nakon sušenja}}}{m_{\text{uzorka}}} \cdot 100 \quad (3.31)$$

$$VS (\%) = \frac{m_{\text{nakon sušenja}} - m_{\text{nakon žarenja}}}{m_{\text{uzorka}}} \cdot 100 \quad (3.32)$$

$$\text{Садржај пепела} (\%) = \frac{m_{\text{nakon žarenja}}}{m_{\text{uzorka}}} \cdot 100 \quad (3.33)$$

$$\text{Садржај воде} (\%) = 100 - TS(\%) \quad (3.34)$$

где је  $m_{\text{nakon sušenja}}$  маса гуча са узорком након сушења на 105°C,  $m_{\text{nakon žarenja}}$  маса гуча са пепелом након жарења на 550 °C, а  $m_{\text{uzorka}}$  маса гуча са узорком која је коришћена за одређивање укупних и испарљивих чврстих материја.

### 3.7.8. Елементарна органска микроанализа

Садржај основних елемената из којих се састоји кукурузна стабљика одређиван је у сировој биомаси и третираним узорцима који су одабрани за валоризацију, применом конвенционалне методе [310]. Садржај угљеника (C), водоника (H), азота (N), сумпора (S) и кисеоника (O) одређен је применом CHNS анализатора Elementar Vario EL III, CNS. Метода се заснива на сагоревању одмерених узорака на 1150 °C у атмосфери кисеоника у присуству катализатора. Узорци су одмерени помоћу високо прецизне аналитичке ваге. Оксидацијом узорака се угљеник преводи у угљеник (IV) оксид, водоник у водену пару, органски азот се редукује до гасовитог азота, а сумпор се преводи у сумпор (IV) оксид. Настали оксиди се раздвајају у струји хелијума и одређује се њихов међусобни однос. Уређај одређује садржај C, H, N и S, док је садржај O израчунат на основу разлике, а према једначини:

$$O(\%) = 100 - (C(\%) + H(\%) + N(\%) + S(\%) + \text{Садржај пепела} (\%)) \quad (3.35)$$

### 3.7.9. Одређивање бруто садржаја топлотне енергије

Бруто садржај топлотне енергије која се ослободи након потпуног сагоревања биомасе одређена је применом тзв. калориметријске бомбе [311]. Одмерено је приближно 0,2 g сирове биомасе и пренето у металну чашу. Чаша је постављена у носач, а конач за паљење је уроњен у биомасу и повезан са колом за паљење. Носач са узорком је постављен у комору, тзв. „бомбу“, која је затворена и испуњена кисеоником до 30 bar. Састављена „бомба“ је потом смештена у калориметар, одмерена маса узорка је ручно унета у калориметар и процес паљења је започет. Након потпуног сагоревања биомасе, бруто садржај енергије (енгл. *Gross Calorific Value, GCV*) је приказан на екрану калориметра, док је нето садржај енергије (енгл. *Net Calorific Value, NCV*) израчунат према једначини:

$$NCV (kJ g^{-1}) = GCV - 2,776 \cdot \text{Садржај воде} (\%) \quad (3.36)$$

где је 2,776 kJ g<sup>-1</sup> вредност енталпије испаравања.

### 3.7.10. Диференцијално бојење

Како би се уочиле промене у морфологији кукурузне стабљике пре и након третмана нетермалном плазмом, примењена је метода диференцијалног бојења [312]. Од боја су коришћене Astra blue™, која боји целулозна влакна у плаво само у одсуству лигнина, и сафранин, који боји лигнин у црвено независно од присуства целулозе. Узорци су претходно припремљени на начин описан у одељку 3.3. Диференцијалном бојењу су подвргнути и сирови узорци и узорци третирани нетермалном плазмом током 20 s.

Бојење је вршено у два корака. Узорак је најпре фиксиран на предметном стаклу, на њега је нанет 1% раствор сафранина, а вишак боје је након 3 min уклоњен испирањем узорка водом. Затим је на узорак нанет 1% раствор Astra blue™ и након 3 min је поновљен поступак испирања вишка боје водом. Овако обојени узорци су осушени на собној температури и посматрани под светлосним микроскопом Axio Imager A1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH.). Схематски приказ овог поступка приказан је на слици 3.21.



Слика 3.21. Схематски приказ диференцијалног бојења сирових и третираних попречних пресека кукурузне стабљике

### 3.7.11. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR)

Техника инфрацрвене спектроскопије са Фуријеовом трансформацијом (енгл. *Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR*) користи упадно зрачење широке спектралне области и заснива се на могућности молекула да апсорбују светлост на фреквенцијама специфичним за одређене функционалне групе присутне у молекулу, као и везе формиране унутар молекула. Како не постоје два молекула која имају исти инфрацрвени спектар, ова метода је погодна за утврђивање карактеристичних промена изазваних третманом биомасе. FTIR спектроскопија је коришћена за анализу сирове и третиране биомасе, али и хемицелулозних и лигнинских фракција изолованих након третмана. За потребе ове анализе коришћен је Nicolet™ iSTM 10 FTIR спектрометар у опсегу од  $4\,000\text{ cm}^{-1}$  до  $400\text{ cm}^{-1}$ . Резолуција при снимању износила је  $4\text{ cm}^{-1}$ , са 32 скенирања по спектру. Узорци су анализирани без претходног пелетирања са калијум бромидом и током анализе није дошло до њиховог оштећења.

За додатну процену промена у структури лигноцелулозне биомасе изазване различитим третмани праћена су два параметра – интензитет водоничних веза (енгл. *Hydrogen Bond Intensity, HBI*) и укупни индекс кристаличности (енгл. *Total Crystallinity Index, TCI*). Ови параметри представљају односе апсорбанци на различитим таласним дужинама и израчунати су применом једначина:

$$HBI = \frac{A_{3400}}{A_{1323}} \quad (3.37)$$

$$TCI = \frac{A_{1369}}{A_{2900}} \quad (3.38)$$

где су  $A_{3400}$ ,  $A_{1323}$ ,  $A_{1369}$  и  $A_{2900}$  апсорбанце измерене на  $3\,400$ ,  $1\,323$ ,  $1\,369$  и  $2\,900\text{ cm}^{-1}$ , респективно [313].

### 3.7.12. Раман спектроскопија

Раман спектроскопија се користи за детектовање симетричних вибрација унутар молекула и као таква је комплементарна FTIR спектроскопији, којом се детектују асиметричне вибрације. Метода се заснива на расипању светлости из видљиве и UV области на молекулима узорка уколико дође до промене поларизабилности молекула. Као извор зрачења најчешће се користе ласери веома интензивног монохроматског зрачења. Међутим, услед присуства лигнина у узорцима лигноцелулозне биомасе може доћи до појаве флуоресценције која омета

јасно читавање спектра [314]. Стога је за анализу сирове и третиране биомасе, као и хемицелулозних и лигнинских фракција изолованих након третмана коришћен MIRA XTR DS систем опремљен са XTR алгоритмима помоћу којих се спектри могу добити уз поништавање флуоресценције. Као извор зрачења коришћен је ласер класе 3В у складу са стандардом EN 60825-1. Спектри су снимани на 785 nm у опсегу од  $400\text{ cm}^{-1}$  до  $2\,300\text{ cm}^{-1}$ , са спектралном резолуцијом од  $8\text{ cm}^{-1}$  до  $10\text{ cm}^{-1}$  и временом интеграције од 10 s. Снимљени спектри су обрађивани применом MiraCal DS 1.2.55.0 софтвера. Узорци су анализирани без претходне припреме, употребом вијале за снимање, и током анализе није дошло до њиховог оштећења.

### 3.7.13. Скенирајућа електронска микроскопија (SEM)

Промене у морфологији биомасе, изазване применом различитих третмана, анализирани су применом скенирајуће електронске микроскопије (енгл. *Scanning Electron Microscopy, SEM*). На сирову и третирану биомасу је најпре нанет премаз смеше злата и паладијума помоћу Polaron SC502 распршивача, како би се осигурала добра проводљивост узорака. Након тога, промене у морфологији су праћене употребом уређаја TESCAN Mira3 XMU, при чему је напон убрзања јона износио 10 kV.

### 3.7.14. Течна хроматографија високих перформанси (HPLC)

Анализа рекуперисаних еутектичких смеша, узорака припремљених кроз NREL протокол за одређивање садржаја структурних угљених хидрата, као и одабраних хидролизата третиране биомасе, вршена је применом система за течну хроматографију високих перформанси Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific). За раздвајање шећера коришћена је реверзно фазна Agilent Hi-Plex Ca<sup>2+</sup> колона ( $300 \cdot 7,7\text{ mm}$ ,  $8\text{ }\mu\text{m}$ ) на  $80\text{ }^\circ\text{C}$ . Као мобилна фаза коришћена је вода HPLC-чистоће, са протоком од  $0,6\text{ mL min}^{-1}$ . Запремина узорака коришћена за анализу је износила  $10\text{ }\mu\text{L}$ , док је дужина трајања анализе износила 20 min. Производи су детектовани применом RI детектора (RefractoMax 520, ERC), који је претходно загрејан на  $40\text{ }^\circ\text{C}$ . Резултати су прикупљени и обрађени применом софтверског пакета Chromeleon 7.2 CDS. Концентрације шећера су прерачунате на основу стандардне праве за жељене шећере – глюкозу, ксилозу, арабинозу и манозу.

### 3.7.15. Порозиметрија са интрузијом живе (MIP)

Како би се утврдиле промене у порозности биомасе пре и након третмана, вршена су порозиметријска мерења са интрузијом живе (енгл. *Mercury Intrusion Porosimetry, MIP*). За ову анализу одабрана је сирова биомаса, биомаса третирана Фентоновим реагенсом и комбинованим нетермална плазма/Фентоновим третманом, како би се испитао допринос плазме конвенционалном третману Фентоновим реагенсом у циљу повећања порозности третиране биомасе. Мерења су започета одређивањем привидне густине узорка, интрузијом, односно увођењем живе у пикнометар са узорком на макропорној јединици Macropores Unit 120. Анализа је затим извођена у потпуно аутоматизованом конвенционалном порозиметру Carlo Erba, модел 2000. Овај уређај ради на високим притисцима, у опсегу од 0,1 MPa до 200 MPa, чиме се омогућава интрузија живе у поре узорка чији је ред величине у опсегу од 7,5 nm до 15 000 nm. Анализа је вршена у два понављања. Резултати су прикупљени и обрађени применом софтвера Milestone 200 и добијени су подаци о укупној специфичној запремини пора ( $V_{tot}$ ), специфичној површини пора ( $S_{Hg}$ ), просечном пречнику најзаступљенијих пора ( $D_{av}$ ) и стварној густини пора ( $BD$ ), односно порозности испитиваног узорка ( $P$ ).

### 3.7.16. Рендгенска дифракциона анализа (XRD)

Промене у кристаличности целулозне фракције биомасе пре и након третмана праћене су рендгенском дифракционом анализом (енгл. *X-ray diffraction, XRD*). Анализа је вршена применом Philips PW 1050 дифрактометра са Cu K $\alpha$  зрачењем које је монохроматизовано помоћу Ni филтера. Мерења су вршена у складу са Bragg-Brentano геометријом, при чему је опсег дифракционих углова  $2\theta$  износио од  $5^\circ$  до  $60^\circ$ , са кораком од

0,02°, док је време експозиције износило 3 s по кораку. Прикупљени подаци су обрађени применом Fituk софтверског пакета. Извршена је деконволуција XRD профила за уочавање кристалиничних и аморфних региона. Индекс кристалиничности,  $CrI$ , прерачунао је према једначини:

$$CrI (\%) = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \cdot 100 \quad (3.39)$$

где је  $I_{002}$  интензитет пика дифракције на  $2\theta \gg 22,5^\circ$ , а  $I_{am}$  је интензитет аморфног региона ( $2\theta \gg 16,3^\circ$ ) [315].

### 3.8. Валоризација третиране биомасе

Након фракционисања кукурузне стабљике применом третмана развијених у оквиру ове дисертације, третирана биомаса која се доминантно састоји из целулозе је подвргнута валоризацији. У ову сврху одабрана је биомаса добијена након комбинованог плазма/алкалног третмана и плазма/NADES третмана. Ове фракције су одабране јер је након поменутих третмана остварена највећа делигнификација третиране биомасе. Могућност искоришћења третиране биомасе је испитана кроз поступке млечно-киселинске ферментације, алкохолне ферментације и анаеробне дигестије.

#### 3.8.1. Млечно-киселинска ферментација

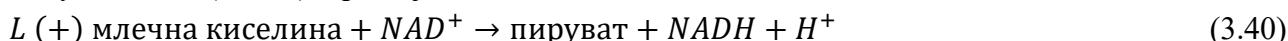
Могућност искоришћења третиране биомасе као извора угљеника за производњу млечне киселине испитана је ферментисањем хидролизата третиране биомасе помоћу млечно-киселинске бактерије *L. rhamnosus*. Третирана биомаса је хидролизована на начин описан у одељку 3.6. Добијени хидролизати су обогаћени органским изворима азота и солима на основу концентрације редукујућих шећера, тако да њихов однос и количина буду истоветни стандардној подлози за гајење бактерија млечне киселине, MRS бујону. У хидролизат је додат квашчев екстракт у концентрацији од 5 g L<sup>-1</sup>, месни екстракт у концентрацији од 10 g L<sup>-1</sup> и пептон у концентрацији од 10 g L<sup>-1</sup>. Одговарајуће соли су додате у следећим концентрацијама: натријум-ацетат – 5 g L<sup>-1</sup>, амонијум-цитрат – 2 g L<sup>-1</sup>, магнезијум-сулфат – 0,2 g L<sup>-1</sup> и манган сулфат – 0,05g L<sup>-1</sup>. рН вредност припремљеног супстрата је подешена на 6,5 помоћу 30% (мас.) раствора натријум хидроксида. Припремљени хидролизати су стерилисани филтрирањем кроз 0,22 μm филтер. На овај начин спречено је стварање инхибиторних једињења која настају разградњом шећера током стерилизације у аутоклаву. Ферментација је започета инокулисањем супстрата преконоћном културом *L. rhamnosus* у концентрацији од 6% (зап.). Узорци су инкубирани у микроаерофилним условима на 37 °C, током 24 h, уз благо мешање (100 rpm). У току ферментације су вршене корекције рН вредности. Процена ефикасности млечно-киселинске ферментације извршена је одређивањем концентрације редукујућих шећера (одељак 3.6.2.), произведене млечне киселине и броја живих ћелија у нултом и 24. h од почетка ферментације. При истим условима извођена је и ферментација рекуперисане еутектичке смеше након комбинованог плазма игла/NADES третмана (одељак 3.5.4.), а затим је одређен и број живих ћелија након 24 h.

##### 3.8.1.1. Одређивање концентрације млечне киселине

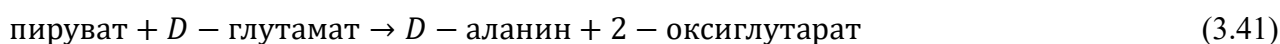
Депротеинизација ферментационог медијума је неопходан корак пре одређивања концентрације млечне киселине. Овај корак се заснива на таложењу протеина у присуству Carrez-ових реагенаса [316]. Најпре су припремљени реагенси, при чему *Carrez I* представља 3,6% (мас.) раствор калијум-феро-цијанида, а *Carrez II* представља 7,2% (мас.) раствор цинк-сулфата. У зависности од очекиване концентрације произведене млечне киселине, ферментациони медијум је разблажен пребацавањем одговарајуће запремине у нормални суд од 10 mL, након чега је додато 500 μL *Carrez I* раствора, 500 μL *Carrez II* раствора и 1 mL 0,1 M натријум хидроксида. Садржај нормалног суда је измешан након додавања сваког од реагенаса, а затим је допуњен дестилованом водом до црте. Након извршене депротеинизације, смеша је филтрирана кроз 0,22 μm филтер. Добијени раствори су коришћени за одређивање

концентрације млечне киселине. Уколико није било могуће одредити концентрацију млечне киселине одмах након депротеинизације, депротеинизовани филтрати су чувани у замрзивачу како би се спречило кварење.

Концентрација млечне киселине одређивана је у ферментационом медијуму у нултом и 24. h од почетка ферментације, применом стандардног ензимског кита (Megazyme<sup>®</sup>, Ирска) [307,316]. Метода се заснива на оксидацији L (+) млечне киселине до пирувата. Ова оксидација се одвија посредством L-лактат дехидрогеназе (L-LDH) у присуству никотинамид-аденин динуклеотида (NAD<sup>+</sup>), према једначини:



Равнотежа ове реакције је умерена у корист пирувата и NADH, што отежава спектрофотометријско мерење концентрације NADH, која уједно одговара и концентрацији млечне киселине. Стога је неопходно спречити одигравање повратне реакције и превести пируват у D-аланин и 2-оксиглутарат применом ензима D-глутамат-пируват-трансминазе и D-глуатамата у вишку:



Концентрација NADH се одређује спектрофотометријски, мерењем апсорбанце раствора на 340 nm. Ова концентрација одговара концентрацији L (+) млечне киселине присутне у испитиваном узорку. За одређивање концентрације млечне киселине коришћени су следећи реагенси:

- Реагенс 1 (припремљен од стране произвођача), који је садржао 0,5 М глицил-глицин пуфер (pH 10), 0,5 М D-глутамат и 0,02% натријум-азид
- Реагенс 2 (припремљен непосредно пред употребу), који је садржао 380 mg NAD<sup>+</sup> у 5,5 mL дестиловане воде и чуван је на -20 °C, а током извођења методе је чуван на хладном
- Реагенс 3 (припремљен од стране произвођача), који представља суспензију ензима D-глутамат-пируват-трансминазе, активности 1 300 IU mL<sup>-1</sup>
- Реагенс 4 (припремљен од стране произвођача), који представља суспензију ензима L-лактат дехидрогеназе, активности 2 000 IU mL<sup>-1</sup>

Поступак одређивања концентрације млечне киселине је неопходно изводити на температури до 25 °C. Реакција се изводи у киветама минималне запремине 3 mL. Најпре је одмерено 1,5 mL дестиловане воде, у коју је додато 100 μL узорка, а потом и 500 μL реагенса 1, 100 μL реагенса 2 и 20 μL реагенса 3, редом. Упоредо је припремљена и слепа проба, која је уместо узорка садржала дестиловану воду. Садржај у киветама је промешан стакленим штапићем. Након 3 min је измерена апсорбанца ( $A_1$ ) на 340 nm, у односу на дестиловану воду. Након читавања прве апсорбанце, у реакциону смешу је додато 20 μL реагенса 4. Садржај у киветама је промешан и друга апсорбанца ( $A_2$ ) је измерена након 10 min. Концентрација млечне киселине ( $c_{MK}$ ) у ферментационом медијуму израчуната је према једначини:

$$c_{MK} (g L^{-1}) = \frac{V \cdot M}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta A_{MK} \cdot F \quad (3.42)$$

где је  $V$  коначна запремина узорка у кивети након додавања реагенса ( $mL$ ),  $M$  моларна маса млечне киселине ( $90,1 g mol^{-1}$ ),  $\varepsilon$  екстинциони коефицијент на 340 nm ( $6 300 L mol^{-1} cm^{-1}$ ),  $d$  дужина светлосног пута ( $cm$ ),  $v$  запремина узорка ( $mL$ ),  $F$  фактор разблажења, а  $\Delta A_{MK}$  је разлика апсорбанци узорка ( $A_{UZ}$ ) и слепе пробе ( $A_{SP}$ ), добијена према једначини:

$$\Delta A_{MK} = (A_2 - A_1)_{UZ} - (A_2 - A_1)_{SP} \quad (3.43)$$

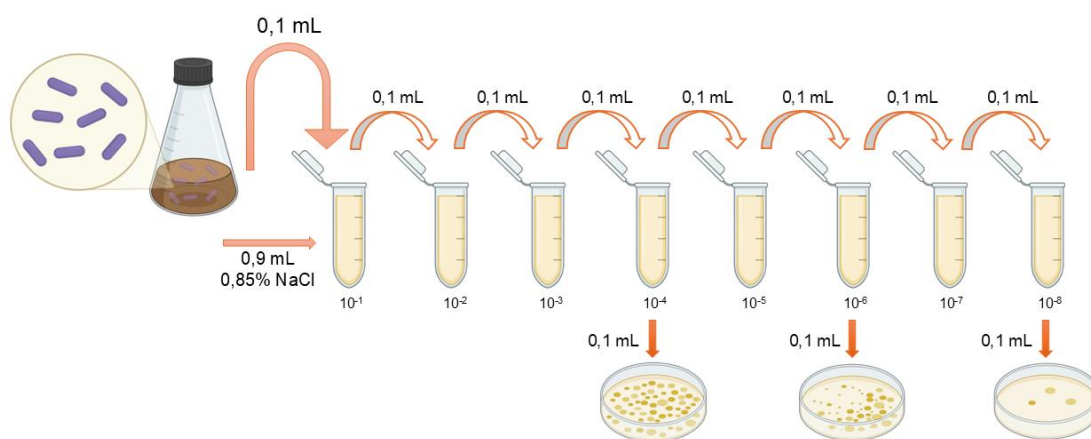
Принос млечне киселине ( $Y_{MK}$ ) израчунат је према једначини:

$$Y_{MK} (g \text{ млечне киселине } g^{-1} \text{ ред. шећера}) = \frac{c_{MK}}{c_{red,0} - c_{red,24}} \quad (3.44)$$

где је  $c_{MK}$  експериментално одређена концентрација млечне киселине,  $c_{red,0}$  концентрација редукујућих шећера у хидролизату на почетку ферментације, а  $c_{red,24}$  концентрација редукујућих шећера у ферментационом медијуму након ферментације.

### 3.8.1.2. Одређивање броја живих ћелија

Број живих ћелија одређен је у ферментационом медијуму применом измењене Кохове методе, прилагођене за рад у малим запреминама [317]. Асептично је одмерено 0,1 mL ферментационог медијума и помешано са 0,9 mL стерилног 0,85% (мас.) раствора натријум хлорида, чиме је добијено разблажење  $10^{-1}$ . Након мешања, 0,1 mL овако направљеног разблажења помешано је са нових 0,9 mL стерилног 0,85% (мас.) раствора натријум хлорида. На исти начин припремљена је серија разблажења, при чему је свако следеће разблажење било десет пута веће. Поступак је поновљен седам пута, тако да је највеће разблажење износило  $10^{-8}$ . Затим је из епандорфа са узорцима разблаженим четири, шест и осам пута пренето по 0,1 mL у Петри шоље са одговарајућом ознаком ( $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  и  $10^{-8}$ ). Као хранљива подлога коришћен је MRS агар у случају *L. rhamnosus*, односно сладни агар у случају *S. cerevisiae*. Узорци у Петри шољама су преливени једним слојем истопљеног MRS агара или сладног бујона. Након очвршћавања првог слоја подлоге, Петри шоље су преливене новим слојем MRS агара, како би се обезбедили микроаерофилни услови за раст бактерија, док Петри шоље са квасцем нису преливане другим слојем сладног агара. Петри шоље су затим инкубирани у статичним условима, у термостату на 37 °C током 24 h. Број израслих колонија је одређиван бројањем, а укупан број живих ћелија у 1 mL ферментационог медијума добијен је множењем укупног броја колонија израслих на Петри шољи са одговарајућим разблажењем. Поступак одређивања броја живих ћелија схематски је приказан на слици 3.22.



Слика 3.22. Одређивање броја живих ћелија Коховом методом

### 3.8.2. Алкохолна ферментација

Искоришћење третиране биомасе као супстрата за производњу биоетанола анализирано је ферментацијом хидролизата третиране биомасе помоћу квасца *S. cerevisiae var. elipsoides*. Ферментација је извођена шаржним поступком на 30 °C током 24 h. Најпре су припремљени хидролизати третиране биомасе, тако што је третирана биомаса подвргнута ензимској хидролизаци са комерцијалном смешом целулаза, хемицелулаза и  $\beta$ -галактозидаза, Cellic STec 2, према поступку описаном у одељку 3.6. Добијени хидролизат је затим обogaћен органским изворима азота, како би се обезбедили оптимални услови за раст квасца продуцента биоетанола [318]. У хидролизат је додат квашчев екстракт у концентрацији од 3 g L<sup>-1</sup>, сладни екстракт у концентрацији од 3 g L<sup>-1</sup> и триптон у концентрацији од 5 g L<sup>-1</sup>. рН вредност припремљеног супстрата је подешена на 5,5 помоћу 30% (мас.) раствора натријум хидроксида. Као и у случају млечно-киселинске ферментације, стерилизација припремљених хидролизата је вршена филтрирањем кроз 0,22  $\mu$ m филтере. Ферментација је започета инокулисањем супстрата преконоћном културом *S. cerevisiae* у концентрацији од 10% (зап.). У току ферментације су вршене корекције рН вредности. Процена ефикасности алкохолне ферментације извршена је одређивањем концентрације редукујућих шећера (одељак 3.6.2.), произведеног биоетанола (одељак 3.8.2.1.) и броја живих ћелија (одељак 3.8.1.2.).

### 3.8.2.1. Одређивање концентрације биоетанола

Концентрација биоетанола је одређивана применом HPLC анализе. У ову сврху коришћен је систем који је претходно описан (одељак 3.7.14.), уз примену исте колоне, како би се омогућило раздвајање шећера присутних у ферментационом медијуму. Аликвоти узорака прикупљени у жељеним временским интервалима су филтрирани кроз 0,22  $\mu\text{m}$  филтер, а затим подвргнути анализи. Концентрација биоетанола у ферментационом медијуму је израчуната на основу стандардне праве конструисане за етанол различитих концентрација, а према једначини:

$$c_{\text{EtOH}} \text{ (g L}^{-1}\text{)} = \frac{P_{\text{HPLC}}}{0,7156} \cdot R \quad (3.45)$$

где је  $P_{\text{HPLC}}$  површина пика хроматограма при одговарајућем ретенционом времену ( $\mu\text{RIU}\cdot\text{min}$ ), а  $R$  је разблажење узорка.

Принос биоетанола ( $Y_{\text{EtOH}}$ ) израчунат је према једначини:

$$Y_{\text{EtOH}} \text{ (g биоетанола g}^{-1}\text{ ред. шећера)} = \frac{c_{\text{EtOH}}}{c_{\text{red},0} - c_{\text{red},24}} \quad (3.46)$$

где је  $c_{\text{EtOH}}$  експериментално одређена концентрација биоетанола,  $c_{\text{red},0}$  концентрација редукујућих шећера у хидролизату на почетку ферментације, а  $c_{\text{red},24}$  концентрација редукујућих шећера у ферментационом медијуму након ферментације.

### 3.8.3. Анаеробна дигестија

#### 3.8.3.1. Биохемијски потенцијал метана

Искоришћење третиране биомасе као супстрата за производњу биогаза у процесу анаеробне дигестије анализирано је применом аутоматизованог система за тестирање потенцијала за производњу метана, AMPTS II (енгл. *Automatic Methane Potential Test System*). Биохемијски потенцијал метана (енгл. *Biochemical Methane Potential, BMP*) је тестиран током 30 дана. На овај начин одређена је прелиминарна биоразградивост третиране биомасе у лабораторијским условима применом стандардизоване методе, те је могуће добијене резултате поредити са другим конвенционалним BMP тестовима. Предност примене AMPTS II система у односу на конвенционалне анаеробне дигесторе се огледа у мањој количини узорка потребној за инокулсање, једноставном начину покретања анаеробне дигестије, краћој дужини трајања процеса, аутоматизованом детектовању произведене запремине гаса, као и могућности праћења остварених резултата у сваком тренутку током извођења процеса [319].

AMPTS II систем се састоји из три јединице – јединице за инкубацију узорака (А), јединице за апсорпцију угљеник (IV) оксида (Б) и јединице за мерење запремине произведеног гаса (В), приказаних на слици 3.23.



Слика 3.23. Аутоматизовани систем за тестирање потенцијала за производњу метана (AMPTS II)

Јединица *A* се састоји из 15 стаклених ферментора опремљених ротирајућим мешалицама, како би се обезбедило униформно мешање инокулисаних узорака. Укупна запремина ферментора износи 500 mL, при чему се у ферменторе додаје до 400 mL инокулисаног узорка, а преостала запремина се оставља слободна за производњу гаса. Ферментори су смештени у воденом купатилу и осигурани пластичним прстеном којим се потпомаже одржавање температуре унутар воденог купатила константном (37 °C). Јединица *B* се састоји из комплементарних 15 стаклених боца запремине 100 mL, у којима се налази 3 M раствор натријум хидроксида са 0,4% раствором тимолфталейна у апсолутном етанолу као рН индикатора. Ова јединица служи за апсорпцију фракција киселих гасова, попут CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>S, чиме се обезбеђује да само биометан прође до јединице *B*, односно да се као крајњи резултат добије специфична производња биометана. Ову јединицу чини уређај за мерење запремине произведеног биометана и састоји се из резервоара за воду са хелијама за мерење протока биометана. Осим тога, у овој јединици је интегрисана и процесорска јединица за управљање процесом и прикупљање података.

За испитивање могућности производње биогаза кроз процес анаеробне дигестије коришћене су фракције биомасе богате целулозом које заостају након третмана. Сви тестови су вршени у трипликату, при чему је у једној шаржи тестирано пет различитих узорака: 1 – инокулум (негативна контрола), како би се елиминисао принос биогаза који потиче од самог инокулума, 2 – целулоза (позитивна контрола), како би се испитала активност коришћеног инокулума, 3 – сирова биомаса, како би се утврдио утицај примењених третмана на повећање ефикасности производње биогаза, 4 – биомаса третирана комбинованим нетермална плазма/алкалним третманом и 5 – биомаса третирана комбинованим нетермална плазма/природне дубоке еутектичке смеше третманом. Однос инокулума и супстрата је износио 4:1 (g:g), а одговарајуће количине су добијене прерачунавањем на основу садржаја испарљивих чврстих материја у инокулуму и супстрату (одељак 3.7.7.). Анаеробни услови у реакторима су обезбеђени пропуштањем хелијума кроз сваки реактор. Тест је трајао 30 дана, а мезофилни услови су обезбеђени одржавањем температуре воденог купатила на 37 °C.

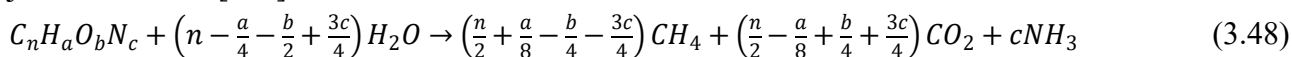
Биохемијски потенцијал метана је изражен као запремина биометана која је произведена по граму испарљивих чврстих материја супстрата додатих у реактор. Међутим, укупна запремина произведеног биометана коригована је за количину биометана која потиче од инокулума, те је BMP за сваки од тестираних супстрата добијен према једначини [320]:

$$BMP (mL CH_4 g^{-1} VS) = \frac{V_S - V_I}{m_{VS,SS}} \quad (3.47)$$

где је  $V_S$  акумулирана запремина биометана произведеног у ферментору који је садржао супстрат и инокулум (mL),  $V_I$  је запремина биометана произведеног у ферментору који је садржао само инокулум (mL), а  $m_{VS,SS}$  је количина органског материјала у супстрату која је подвргнута тестирању (g).

### 3.8.3.2. Теоријски биохемијски потенцијал метана и индекс биодеградабилности

Теоријски биохемијски потенцијал метана (енгл. *Theoretical Biomethane Potential, TBMP*) представља максимални принос биометана који се може произвести по граму испарљивих чврстих материја супстрата при тоталној дигестији органске материје супстрата. Buswell и Mueller су развили стохиометријску једначину којом се овај потенцијал може предвидети (једначина 3.46). Вредност TBMP је прерачуната на основу садржаја основних елемената присутних у биомаси, добијеног према протоколу описаном у одељку 3.7.8., а према једначини 3.47 [318]:



$$TBMP (mL CH_4 g^{-1} VS) = \frac{22,400 \cdot \left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4} - \frac{3c}{4}\right)}{12n + a + 16b + 14c} \quad (3.49)$$

где  $n$ ,  $a$ , и  $c$  представљају број молова С, Н, О и N, респективно, а добијени су дељењем масеног удела сваког од елемената са одговарајућом моларном масом ( $g\ mol^{-1}$ ), док 22 400 представља молску запремину при стандардној температури и притиску ( $mL\ mol^{-1}$ ).

Приликом израчунавања ТВМР претпоставља се да је дошло до потпуне дигестије, односно да је сва органска материја разграђена. Међутим, у пракси то није могуће, нарочито када се користе комплексни хетерогени супстрати, попут лигноцелулозе. Лигнин има највећи утицај на биодеградабилност биомасе, те његово присуство у супстрату смањује реално остварени принос биометана у односу на ТВМР. На основу разлике у теоријском и оствареном приносу биометана, може се одредити индекс биодеградабилности (енгл. *Biodegradability Index, BDI*), који је израчунат према једначини:

$$BDI (\%) = \frac{BMP}{TBMP} \cdot 100 \quad (3.50)$$

где је  $BMP$  остварени принос биометана након 30 дана, а  $TBMP$  је теоријски принос биометана, израчунат применом једначине 3.47.

### 3.9. Статистичка обрада експерименталних резултата

Сви третмани биомасе и њена даља карактеризација су извођени у дупликату, док је валоризација одабраних фракција вршена у трипликату. Резултати су приказани у облику средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. OriginPro® 9.0 софтвер (Northampton, САД) је коришћен за статистичку обраду експерименталних резултата. Како би се проценио статистички значај добијених резултата, коришћени су анализа варијансе (енгл. *one-way ANalysis Of VAriance, ANOVA*) и Tukey тест, при чему су се резултати статистички значајно разликовали уколико је  $P$  вредност била мања од 0,05 ( $P < 0,05$ ). Узорци код којих је уочена статистички значајна разлика обележени су различитим словима, док су узорци који се нису значајно разликовали били обележени истим словом.

Minitab® 18 статистички софтвер (Pittsburgh, САД) је коришћен за дизајнирање експеримената комбинованог нетермална плазма/природне дубоке еутектичке смеше третмана помоћу Тагучијевог ортогоналног низа. Утицај различитих фактора на ефикасност третмана је процењен извођењем једноструке ANOVA анализе са нивоом поузданости од 95%. Допринос ( $C$ ) сваког од фактора смањењу варијансе израчунат је према једначини:

$$C_i (\%) = \frac{SS'_i}{SeqSS_{Total}} \quad (3.51)$$

где је  $SS'_i$  је сума квадрата за фактор  $i$ , а  $SeqSS_{Total}$  је укупна узастопна сума квадрата.

### 3.10. Процена економских и еколошких аспеката примењених третмана

Приликом развијања третмана за делигнификацију лигноцелулозне биомасе, неопходно је узети у обзир одрживост третмана. Као главни показатељи одрживости користе се техно-економска анализа и анализа животног циклуса, тзв. *LCA* (енгл. *Life Cycle Assesment*). Ови алати се заснивају на испитивању економске исплативости, еколошког и социјалног аспекта примењених третмана [321,322]. Спровођење ових анализа је нарочито важно приликом скалирања процеса на ниво пилот постројења или на индустријски ниво. Како је главни циљ ове дисертације био развој и оптимизација третмана на лабораторијском нивоу, поменуте анализе нису вршене. Процена економских и еколошких аспеката третмана развијених у оквиру ове дисертације је вршена на основу енергије коју је потребно уложити за извођење третмана, реагенаса који су коришћени у третману и самих карактеристика третмана. Додатно, након скалирања третмана кукурузне стабљике природним дубоким еутектичким смешама у плазма реактору, овај третман је одабран као модел за процену енергетске ефикасности производње биогаса. Биомаса третирана еутектичком смешом у плазма реактору подвргнута је анаеробној дигестији на начин описан у одељку 3.8.3.1., након чега је уследила анализа енергетске ефикасности процеса.

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 4.1. Карактеризација кукурузне стабљике

Као модел супстрат за испитивање утицаја нетермалне плазме у третману пољопривредних остатака и биотехнолошкој валоризацији одабрана је кукурузна стабљика. Кукуруз, као једна од најзаступљенијих ратарских култура, има велики економски значај, а количине заостале биомасе, пре свега стабљике и окласка, чине је веома доступном и погодном за развој нових биорафинеријских поступака. Удео G-јединице у лигнину кукурузне стабљике је већи у односу на удео S-јединице, што је чини мање отпорном на дејство примењених третмана [323]. У експерименталном раду у оквиру ове дисертације коришћена је кукурузна стабљика са два локалитета и од различитих хибрида, како би се испитала могућност ефикасне валоризације овог модел супстрата и у случају различитог хемијског састава. Приликом развијања и оптимизације третмана лигноцелулозне биомасе, пожељно је да третман буде применљив на супстратима чији састав може варирати у зависности од доступности, уз минималне губитке ефикасности. У зависности од потреба анализа за карактеризацију, биомаса је припремљена на начине описане у одељку 3.3. Изглед попречног пресека и самлевене кукурузне стабљике пре примене третмана приказани су на слици 4.1.



Слика 4.1. Изглед попречног пресека (лево) и самлевене кукурузне стабљике (десно)

Карактеризација узорка кукурузне стабљике са два локалитета, означених као узорак 1 и узорак 2, вршена је применом различитих метода. Одређен је садржај влакана методом по Van Soest-у, садржај лигнина и структурних угљених хидрата применом тзв. NREL протокола, садржај лигнина растворљивог у ацетил бромиду, садржај укупних и испарљивих чврстих материја, воде и пепела, садржај основних елемената, као и бруто и нето садржај топлотне енергије. Добијени резултати приказани су у табели 4.1. Разлике у садржају појединих компоненти у узорку 1, односно узорку 2, последица су различитог порекла стабљике, различите старости биомасе, као и различитих делова стабљике. Наиме, делови стабљике који су ближи корену биљке су знатно већег пречника од делова стабљике при врху биљке. Да би обезбедили добру потпору биљци, делови стабљике ближи корену имају дебљу и чвршћу кору од стабљике при врху, а самим тим и већи удео лигнина. Осим тога, ови делови су заступљенији у већој мери и када је реч о самој количини стабљике која заостаје након жетве. Садржај укупних чврстих материја (TS) је готово исти у оба узорка. Такође, садржај неутралних и киселих детергентских влакана одређених методом по Van Soest-у је упоредив у оба узорка. Међутим, садржај целулозе и лигнина се значајно разликују у анализираним узорцима. Узорак 2 карактерише већи садржај целулозе (51,0%) у односу на узорак 1 (36,0%), док је садржај лигнина у овом узорку очекивано нижи (7,3%) у односу на садржај лигнина у узорку 1 (20,4%). Осим разлике у локалитету и хибриду, разлици у садржају основних компоненти у стабљичи може значајно допринети и начин чувања стабљике након жетве. Уколико се стабљика не чува на адекватан начин, може доћи до повећаног раста микроорганизама који се хране шећерима присутним у стабљичи. Међутим, тешко је обезбедити контролисане услове чувања великих количина стабљике, што често доводи до делимичне разградње шећера и губитка квалитета.

Развој адекватних биорафинеријских поступака који ће бити подједнако ефикасни на биомаси мешовитог састава би значајно унапредио управљање овом пољопривредном биомасом и смањио емисије услед неадекватног разлагања.

Табела 4.1. Својства нетретиране кукурузне стабљике

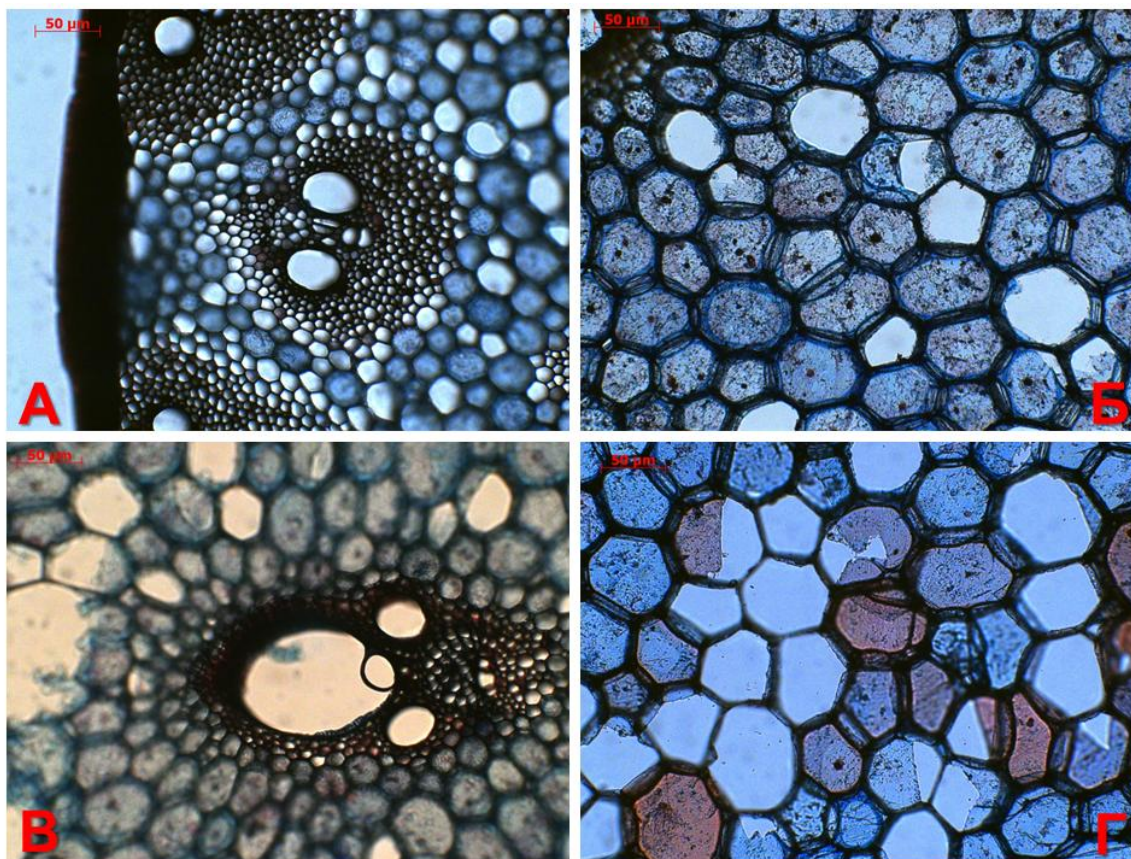
Својство	Узорак 1	Узорак 2
NDF, %	83,3 ± 1,6	85,9 ± 0,3
ADF, %	56,4 ± 2,4	58,2 ± 0,1
ADL, %	20,4 ± 5,3	7,3 ± 0,2
Целулоза, %	36,0 ± 3,0	51,0 ± 0,1
Хемицелулоза, %	26,9 ± 0,8	29,5 ± 0,1
Глукан, %	39,6 ± 1,0	49,6 ± 0,6
Ксилан, %	25,9 ± 0,4	25,6 ± 0,4
Лигнин, %	29,6 ± 0,9	20,6 ± 0,3
ABSL, %	26,0 ± 2,1	36,4 ± 2,4
TS, %	95,1 ± 0,1	95,9 ± 0,1
VS, %	91,4 ± 0,1	90,2 ± 0,1
Садржај пепела, %	3,8 ± 0,2	5,3 ± 0,0
Садржај влаге, %	4,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1
C, %	43,7 ± 1,1	43,6 ± 0,2
H, %	7,7 ± 0,3	7,8 ± 0,1
N, %	0,48 ± 0,0	0,36 ± 0,0
S, %	0,08 ± 0,0	0,04 ± 0,0
O, %	44,4 ± 1,4	43,0 ± 0,4
GCV, $kJ g^{-1}$	17,7 ± 0,0	17,6 ± 0,0
NCV, $kJ g^{-1}$	4,1 ± 0,0	6,2 ± 0,0

NDF – неутрална детергентска влакна; ADF – кисела детергентска влакна; ADL – лигнин нерастворљив у киселим детергентима; ABSL – лигнин растворљив у ацетил бромиду; TS – укупне чврсте материје; VS – испарљиве чврсте материје; GCV – бруто садржај енергије; NCV – нето садржај енергије.

Разлике у садржају лигнина у истом узорку, приказане у табели 4.1, резултат су различитих механизма за одређивање поменуте компоненте применом различитих метода. Конкретно, садржај лигнина одређиван је применом три различите методе – методом по Van Soest-у, применом NREL протокола и методом са ацетил бромидом. Методом по Van Soest-у одређује се садржај лигнина нерастворљивог у киселим детергентима, док се применом NREL протокола добија укупан садржај лигнина, нерастворљивог и растворљивог у сумпорној киселини. Са друге стране, садржај лигнина означен као ABSL заснива се на растворљивости лигнина у 25% раствору ацетил бромида. Лигнин као веома сложени хетерополимер показује различити степен реактивности и растворљивости у сва три поменута растварача, што доводи до разлике у његовом садржају одређеном на три различита начина. Овај проблем је препознат и спроведене су бројне студије које су вршиле упоредну анализу различитих метода за одређивање садржаја лигнина [324–327]. Метода заснована на примени ацетил бромида је брза, једноставна и захтева значајно мање количине узорка за анализу. Осим тога, током извођења методе са ацетил бромидом су примећени најмањи губици лигнина [325]. Циљ ове дисертације је био развијање третмана који ће примарно уклањати лигнин из кукурузне стабљике, те је било неопходно одредити се за краћу и једноставнију методу за праћење промена у садржају лигнина. Стога је ова метода одабрана за процену делигнификације третиране биомасе у даљем експерименталном раду. Разлике у садржају исте компоненте одређеном применом различитих метода уочене су и код структурних угљених хидрата, али су оне мање у односу на лигнин.

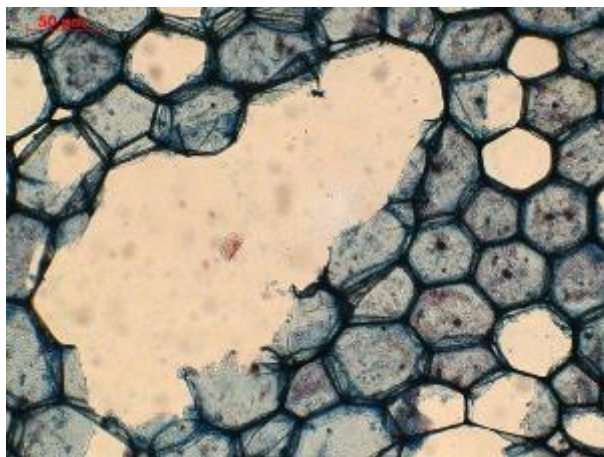
У циљу што ефикаснијег фракционисања биомасе, морфолошке карактеристике могу имати важну улогу током физичко-хемијских третмана који се испитују у овој дисертацији. Морфолошке карактеристике су посматране на попречном пресеку кукурузне стабљике,

применом светлосног микроскопа при различитим увећањима, методом диференцијалног бојења са сафранином и Astra blue™, описаном у одељку 3.6.10. Постоји неколико могућности интеракције плазме и лигноцелулозне биомасе: 1) директан третман лигноцелулозне биомасе плазмом, 2) третман воде или другог воденог медијума плазмом, уз касније додавање биомасе, и 3) *in situ* третман плазмом биомасе у воденом или другом медијуму. У овој дисертацији, најпре је испитана директна интеракција нетермалне плазме са биомасом. Попречни пресеци стабљике су третиран директно нетермалном плазма иглом у трајању од 20 s. Потом су подвргнути диференцијалном бојењу и посматрани под светлосним микроскопом, при различитим увећањима. Изглед спроводних снопића и паренхима кукурузне стабљике пре и након третмана нетермалном плазмом приказани су на слици 4.2.



Слика 4.2. Нетретирана кукурузна стабљика (А, Б) и стабљика третирана нетермалном плазмом током 20 s (В, Г) након диференцијалног бојења, увећани 20 пута

Применом диференцијалног бојења омогућено је јасно уочавање црвених зона, које представљају лигнинску фракцију, и плавих зона, које представљају целулозну фракцију. Црвене зоне су заступљеније у зони спроводних снопића и коре стабљике (ивице попречног пресека стабљике), које су доминантно изграђене од лигнина. Плаве зоне су заступљеније у паренхимском делу стабљике. Применом третмана нетермалном плазмом нису уочене значајне промене у морфологији зоне спроводних снопића, односно доминантно лигнинског дела (слика 4.2., А и В), док су промене у морфологији зоне паренхима, односно целулозом богатог дела (слика 4.2., Б и Г) јасно изражене. Црвене зоне које су присутне у паренхиму третиране кукурузне стабљике највероватније су последица физичког оштећења паренхимских ћелија, услед директне изложености узорка плазми, што је довело до јаснијег уочавања лигнина и његове доступности боји. Такође, потврђено је и да директан третман нетермалном плазмом доводи до оштећења, односно кидања узорка. Разарање ћелија је највеће на месту које се налазило непосредно испод плазма игле, док уочени ефекти опадају радијално од централног места третмана нетермалном плазмом. На слици 4.3. приказано је оштећење и промена структуре и морфологије узорка изазваног третманом нетермалном плазмом.



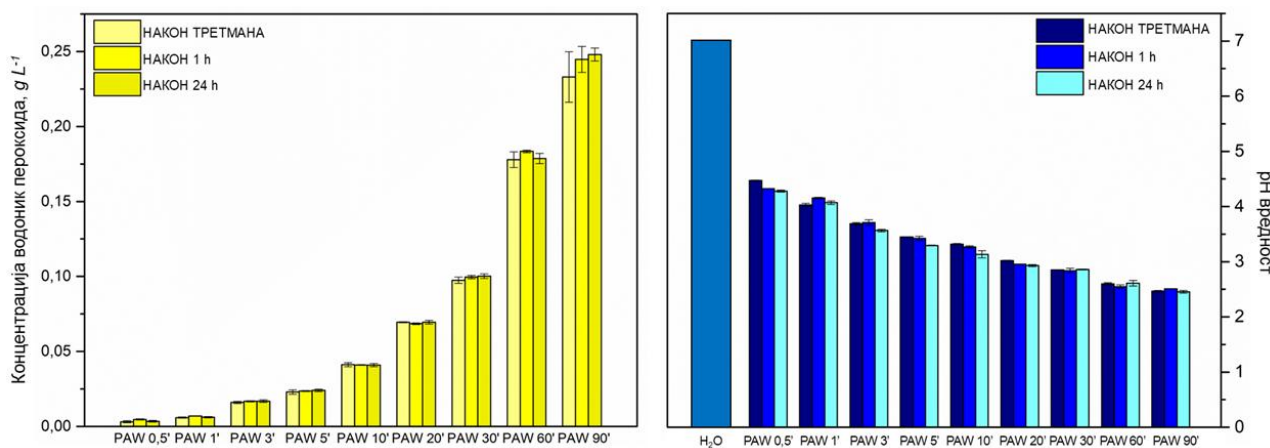
Слика 4.3. Нарушавање структуре узорка изазвано третманом нетермалном плазмом у трајању од 20 s, увећано 20 пута

Поред директног третмана суве биомасе нетермалном плазмом, могуће је користити и различите уделе воде и биомасе током третмана. Како је најпогоднији медијум за извођење биотехнолошких трансформација вода, најпре је испитана интеракција нетермалне плазме са водом и плазма активирана вода је хемијски окарактерисана. Потом су тестирани и различити хидромодули током третмана биомасе, у циљу што ефикаснијег фракционисања и искоришћења.

#### 4.2. Хемијска карактеризација плазма активиране воде

Карактеризација плазма активиране воде је извршена у циљу испитивања могућности употребе нетермалне плазма игле као извора кисеоничних и азотних реактивних врста са водом као медијумом за интеракцију у третману лигноцелулозне биомасе. Ове врсте имају способност да разграде комплексну структуру лигноцелулозне биомасе самостално и у комбинацији са ензимима.

Вода је активирана применом нетермалне плазме у временским интервалима различите дужине. Дестилована вода је третирана 0,5 min (*PAW 0,5'*), 1 min (*PAW 1'*), 3 min (*PAW 3'*), 5 min (*PAW 5'*), 10 min (*PAW 10'*), 20 min (*PAW 20'*), 30 min (*PAW 30'*), 60 min (*PAW 60'*) и 90 min (*PAW 90'*). Након третмана, у плазма активираној води је одређена концентрација насталог водоник пероксида и  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  јона, као представника кисеоничних и азотних реактивних врста, као и рН вредност. Исти параметри су испитивани и након једног и 24 h, како би се утврдила њихова стабилност. Профил концентрације водоник пероксида и рН вредности плазма активиране воде, као и њихова стабилност током чувања на собној температури приказани су на слици 4.4.



Слика 4.4. Стабилност насталог водоник пероксида и рН вредности плазма активиране воде при различитим дужинама третмана (0,5 до 90 min)

Третманом воде нетермалном плазмом настају бројне реактивне кисеоничне и азотне врсте које, заједно са рН вредношћу, представљају јединствене карактеристике плазма активираних воде и одређују могућност и ширину њене примене. Током овог третмана долази до ацидификације, тј. закишељавања воде, при чему рН вредност опада од почетних 7,0 у нетретираној води све до 2,5 у води третираној током 90 min. Највећи пад рН вредности се уочава већ при самом контакту воде са нетермалном плазмом. Након излагања воде нетермалној плазми у трајању од свега 30 s (*PAW 0,5'*) вредност рН је опала за чак две и по јединице. Продужавањем третмана плазмом рН вредност је опадала знатно мањом брзином. Употребом аргона као доводног гаса настају мање количине азотних врста, које као јаке киселине имају значајан утицај на рН вредност [328]. Стога се рН вредност *PAW* може лакше контролисати применом аргона, што је нарочито важно када је циљ очувати угљено-хидратну компоненту третиране биомасе. Концентрација водоник пероксида расте са продужавањем третмана нетермалном плазмом, а настали водоник пероксид остаје стабилан и по престанку третмана. Водоник пероксид је једно од најјачих оксидо-редукционих средстава, а његова концентрација је директно пропорционална редокс потенцијалу *PAW* [329]. Захваљујући стабилности насталог водоник пероксида у *PAW*, одабиром одговарајуће дужине третмана плазмом може се добити *PAW* дефинисане оксидо-редукционе моћи за даљу примену у третману лигноцелулозне биомасе.

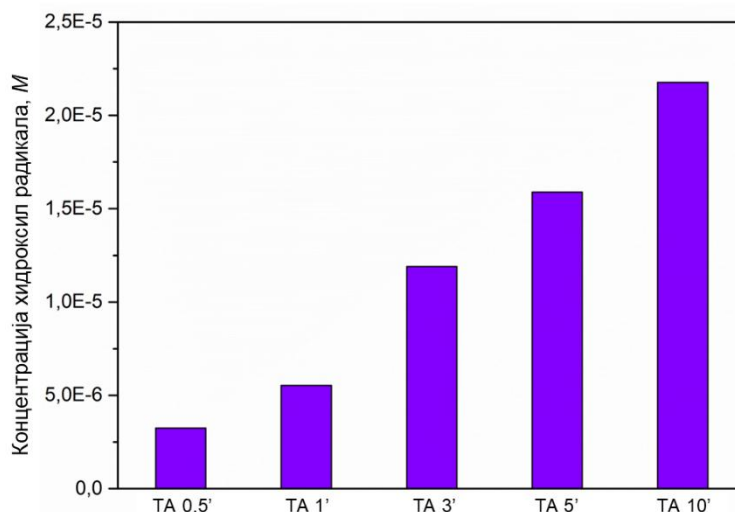
Концентрација и стабилност реактивних азотних врста насталих током третмана плазмом зависила је од дужине трајања третмана и приказана је у табели 4.2.

Табела 4.2. Стабилност јона нитрита и нитрата насталих у плазма активираној води при различитим дужинама третмана (0,5 min до 90 min)

Узорак	Након третмана		Након 1 h		Након 24 h	
	$\text{NO}_2^-$ , $\text{mg L}^{-1}$	$\text{NO}_3^-$ , $\text{mg L}^{-1}$	$\text{NO}_2^-$ , $\text{mg L}^{-1}$	$\text{NO}_3^-$ , $\text{mg L}^{-1}$	$\text{NO}_2^-$ , $\text{mg L}^{-1}$	$\text{NO}_3^-$ , $\text{mg L}^{-1}$
<i>PAW 0,5'</i>	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
<i>PAW 1'</i>	1,0	10,0	1,0	10,0	1,0	0,0
<i>PAW 3'</i>	1,0	25,0	1,0	25,0	1,0	10,0
<i>PAW 5'</i>	5,0	25,0	1,0	25,0	0,0	10,0
<i>PAW 10'</i>	1,0	25,0	1,0	25,0	0,0	10,0
<i>PAW 20'</i>	1,0	25,0	0,0	25,0	0,0	25,0
<i>PAW 30'</i>	0,0	50,0	0,0	50,0	0,0	50,0
<i>PAW 60'</i>	0,0	250,0	0,0	250,0	0,0	250,0
<i>PAW 90'</i>	0,0	250,0	0,0	250,0	0,0	250,0

При краћим третманима (0,5 min до 10 min), јони нитрита и нитрата су остајали присутни у истој концентрацији и 1 h након третмана. Јони нитрита су остали стабилни након 24 h само у случају *PAW 0,5'*, *PAW 1'* и *PAW 3'*. Иако спадају у хемијски стабилне врсте (табела 2.6.), смањење концентрације јона нитрита у *PAW* током чувања воде активираних примењом плазма игле и хибридног плазма реактора, уз аргон као доводни гас приметили су и Чобановић и сар. (2023) [330]. Активирањем воде плазмом у интервалима дужим од 20 min примећено је присуство јона нитрата у значајно већим концентрацијама, док јони нитрита нису били присутни у *PAW* ни непосредно након третмана. У кратким и третманима средње дужине концентрација јона нитрата је опала након 24 h од третмана, док је у дужим временским интервалима, од 20 min до 90 min, њихова концентрација остала непромењена чак и након 24 h. Присуство јона нитрита у траговима, као и мале концентрације присутних јона нитрата су очекивани. Генерисање виших концентрација реактивних азотних врста својствено је плазми која настаје са ваздухом као доводним гасом и крећу се у концентрацији и до 4 mM након 40-минутног третмана, док је овај ефекат мање изражен при коришћењу племенитих гасова, попут аргона [328].

Како би се утврдила концентрација хидроксил радикала, као једне од најважнијих реактивних врста одговорних за делигнификацију, раствор терефталне киселине је третиран нетермалном плазмом у трајању од 0,5 min (TA 0,5'), 1 min (TA 1'), 3 min (TA 3'), 5 min (TA 5') и 10 min (TA 10'). На овај начин омогућено је тзв. „хватање“ хидроксил радикала, чија је дужина полуживота око  $10^{-9}$  s (табела 2.6), а затим и одређивање концентрације насталог радикала спектрофлуорометријском методом описаном у одељку 3.4.3. Као и у случају водоник пероксида и јона нитрата, концентрација насталог хидроксил радикала расте са продужавањем третмана нетермалном плазмом. Профил концентрација хидроксил радикала насталог при различитим дужинама третмана терефталне киселине нетермалном плазмом приказан је на слици 4.5.



Слика 4.5. Концентрација хидроксил радикала након третмана терефталне киселине нетермалном плазмом при различитим дужинама третмана (0,5 до 10 min)

Исти плазма активирани раствори терефталне киселине су анализирани и након четири дана. Концентрација хидроксил радикала у њима је остала готово непромењена. Међутим, стабилност у овим растворима показује радикал који је претходно „ухваћен“ и „заробљен“ у облику 2-хидрокси-терефталне киселине. У реалном воденом систему би ова краткоживећа врста веома брзо прореаговала.

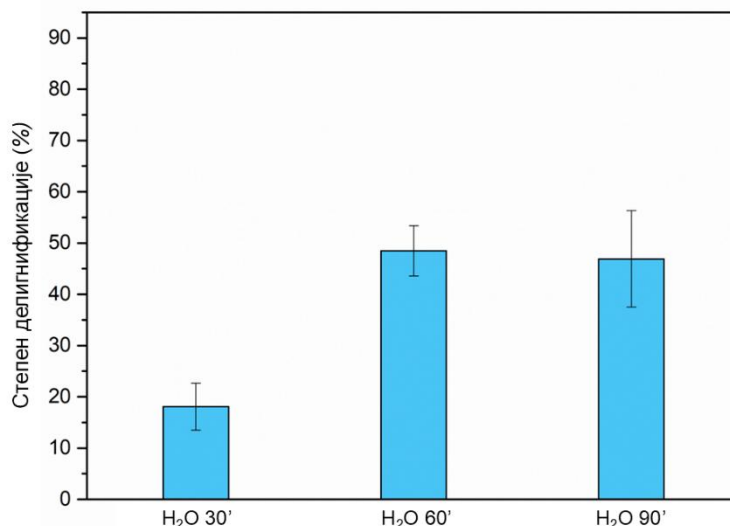
Иако се RAW показала као хемијски стабилна, њеном применом није уочена значајна делигнификација третиране биомасе. Двадесетчетворочасовним излагањем биомасе RAW добијене активирањем током 30 min уклоњено је свега 12,7% лигнина. Да би се постигла ефикасна делигнификација, неопходно је обезбедити континуалну суплементацију хидроксил радикалом кроз третмане супстрата нетермалном плазмом у дужим временским интервалима. Стога је испитана могућност *in situ* уклањања лигнина из кукурузне стабљике у воденом медијуму, уз континуално стварање нових количина реактивних врста које разграђују лигноцелулозну структуру.

#### 4.3. Комбиновани нетермална плазма/вода третман

Комбиновани нетермална плазма/вода третман примењен је како би се испитала могућност употребе воде као зеленог растварача и реактивних врста насталих током третмана нетермалном плазмом, без додатка других хемијских једињења. Најпре је извршено испитивање могућности употребе различитих хидромодула приликом припреме суспензија за третман нетермалном плазмом. Суспензије су припремане мешањем млевене биомасе са дестилованом водом у односима 1:15, 1:20 и 1:30 (g:mL). Умешавањем млевене биомасе са водом при односу 1:10 није било могуће обезбедити да целокупна биомаса буде потопљена у воду, чиме се онемогућава ефикасан пренос масе по читавој запремини третиране суспензије. Такође, третирање суве, тј. непотопљене биомасе нетермалном плазмом би довело до

нехомогеног третмана и механичког разарања, што онемогућава даље искоришћење. Хидромодули већи од 1:30 даље нису разматрани узевши у обзир еколошки и економски аспект. Критеријум за одабир најбољег хидромодула је био најмањи садржај резидуалног лигнина у узорцима након 30-минутног третмана нетермалном плазмом. Садржај резидуалног лигнина у третираним узорцима, при хидромодулима 1:15, 1:20 и 1:30, износио је  $27,9\% \pm 1,2\%$ ,  $21,3\% \pm 1,2\%$  и  $27,8\% \pm 0,2\%$ , респективно, те је хидромодул 1:20 задржан за све наредне експерименте.

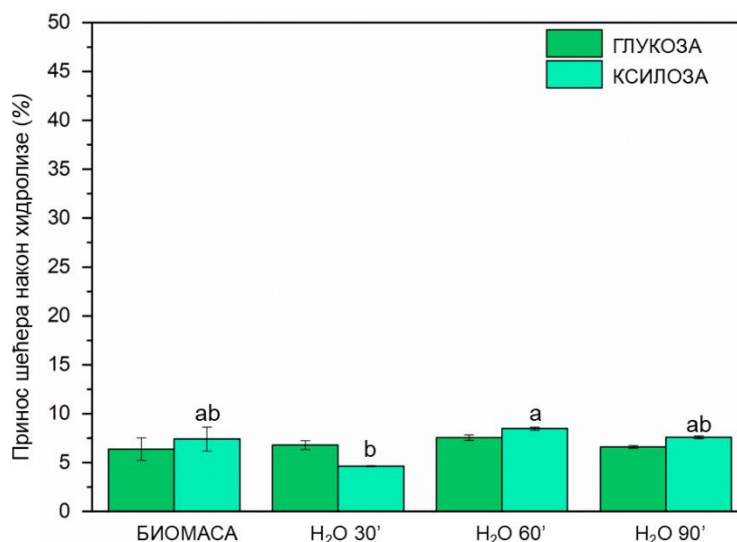
Након утврђивања оптималног хидромодула, третман је извршен и при различитим дужинама третмана, како би се испитао утицај на делигнификацију биомасе. Узорци су третирани 30 min ( $H_2O$  30'), 60 min ( $H_2O$  60'), односно 90 min ( $H_2O$  90'). Остварени степен делигнификације након поменутих третмана приказан је на слици 4.6.



Слика 4.6. Степен делигнификације биомасе третиране комбинованим нетермална плазма/вода третманом током 30 min ( $H_2O$  30'), 60 min ( $H_2O$  60') и 90 min ( $H_2O$  90')

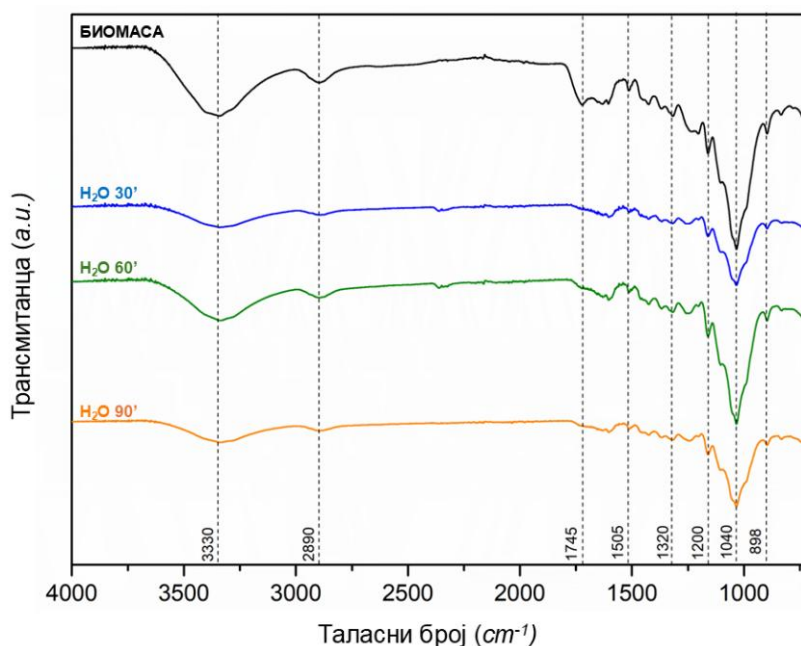
Највиши степен делигнификације од  $48,5\% \pm 4,9\%$  постигнут је након третмана нетермалном плазмом у трајању од 60 min, при чему додатно продужавање третмана до 90 min није довело до уклањања веће количине лигнина. Повећање ефикасности третмана продужавањем његовог трајања може се уочити након примене нетермалне плазме током неколико часова. Наиме, Wright и сар. (2018) су приметили повећање ефикасности третмана кинеског шаша (мискантуса) у воденој средини применом нетермалног DBD плазма реактора тек након 4 h [205]. Третманом пшеничне стабљике, која је по саставу слична кукурузној стабљивици, у нетермалном DBD плазма реактору током 60 min уклоњено је око 22,4% лигнина, док је након 7-часовног третмана степен делигнификације износио чак 74,5% [199]. Међутим, у циљу развоја енергетски и економски повољнијих процеса у односу на постојеће, продужавање третмана нетермалном плазмом дуже од 90 min у овој дисертацији није било разматрано.

Третирана биомаса је даље подвргнута ензимској хидролизи током 48 h, како би се испитала могућност примене комбинованог третмана нетермална плазма/вода за повећање доступности угљено-хидратне компоненте хидролитичким ензимима. Приноси хексоза, изражених на глукозу, и пентоза, изражених на ксилозу, приказани су на слици 4.7.



Слика 4.7. Принос шећера након 48-часовне хидролизе сирове биомасе и биомасе третиране комбинованим нетермална плазма/вода третманом током 30 min ( $H_2O$  30'), 60 min ( $H_2O$  60') и 90 min ( $H_2O$  90')

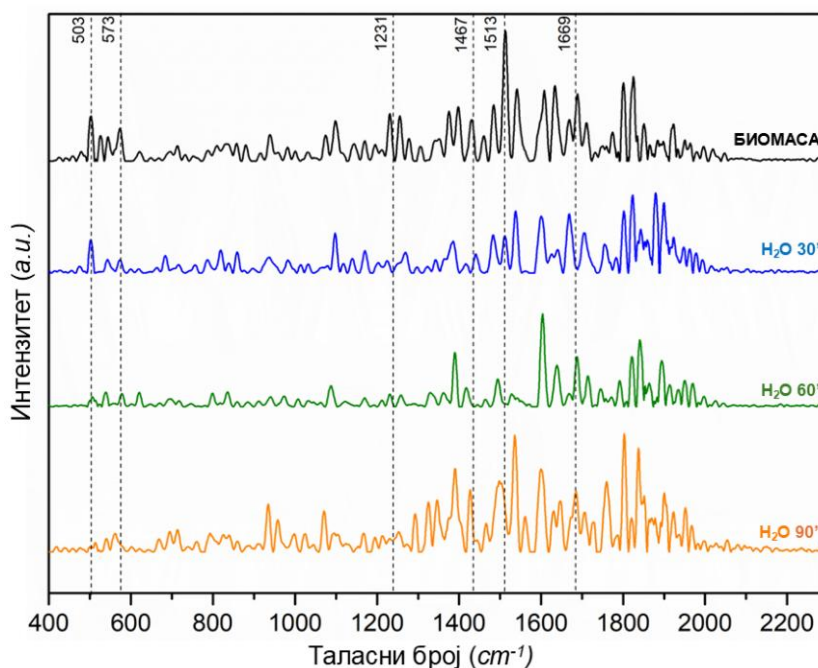
Примењени третмани нису довели до значајног повећања приноса шећера након 48-часовне хидролизе у односу на сирову биомасу, чак ни у узорку у ком је постигнута највећа делигнификација. Узрок недовољно ефикасне ензимске хидролизе највероватније лежи у структурним променама до којих је дошло током третмана. Стога је третирана биомаса анализирана применом FTIR и Раман спектроскопије. Добијени FTIR спектри приказани су на слици 4.8.



Слика 4.8. FTIR спектри сирове биомасе и биомасе третиране комбинованим нетермална плазма/вода третманом током 30 min ( $H_2O$  30'), 60 min ( $H_2O$  60') и 90 min ( $H_2O$  90')

Применом комбинованог нетермална плазма/вода третмана при свим дужинама третмана дошло је до смањења интензитета и проширења пика на око  $3330\text{ cm}^{-1}$ . Овај пик одговара вибрацијама интер- и интрамолекулских водоничних веза [331]. Када је облик овог пика заобљен и широк, водоничне везе су јаке. Слабљењем водоничних веза долази до сужавања и заостравања пика, уз повећање његовог интензитета. Смањење интензитета поменутог пика у третираним узорцима указује на повећан број и јачину водоничних веза услед

примене нетермалне плазме. Истовремено је дошло до веће уређености кристалне структуре третираних узорака, што је утицало на повећање укупног индекса кристаличности (TCI) од 0,93 у сировој биомаси до 0,98 у третираним узорцима. Повећање кристаличности третиране биомасе ограничило је дифузију макромолекула попут ензима, као и интеракцију са активним центром ензима, резултирајући малим приносима шећера након хидролизе. Вибрације везе у метил и метиленским групама целулозе се на спектру уочавају као пик на око  $2\ 890\ \text{cm}^{-1}$  [332]. Интензитети пикова на око  $1\ 745\ \text{cm}^{-1}$  и  $1\ 040\ \text{cm}^{-1}$ , који потичу од хемицелулозе [333,334], смањују се применом третмана нетермалном плазмом, указујући на њену делимичну разградњу током третмана. Ово је нарочито изражено у узорку третираном 30 min, у коме је уједно и принос ксилозе након ензимске хидролизе био најмањи. До уклањања хемицелулозе је дошло услед кидања  $\beta$ -гликозидних веза, што се на спектрима уочава као смањење интензитета пика на  $898\ \text{cm}^{-1}$ . Сирингил јединица лигнина даје пик на око  $1\ 320\ \text{cm}^{-1}$  [335]. Смањење интензитета овог пика, као и пика на око  $1\ 505\ \text{cm}^{-1}$  потврђује да је део лигнина уклоњен током третмана. Такође, применом нетермалне плазме дошло је до смањења броја и интензитета пикова карактеристичних за ароматичну структуру лигнина на делу спектра од  $1\ 400\ \text{cm}^{-1}$  до  $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$  [336]. Сличне промене у структури третираних узорака детектоване су и применом Раман спектроскопије. Раман спектри сирове биомасе и третираних узорака приказани су на слици 4.9.



Слика 4.9. Раман спектри сирове биомасе и биомасе третиране комбинованим нетермална плазма/вода третманом током 30 min ( $H_2O\ 30'$ ), 60 min ( $H_2O\ 60'$ ) и 90 min ( $H_2O\ 90'$ )

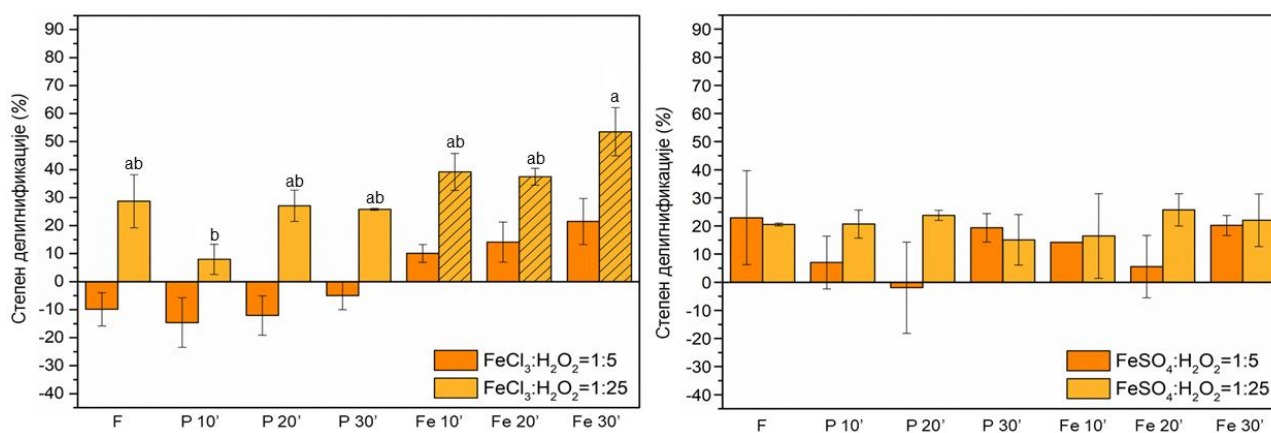
Пикови на око  $503$  и  $573\ \text{cm}^{-1}$  потичу од нецелулозних структурних полисахарида [337]. Смањење интензитета ових пикова са продужавањем третмана нетермалном плазмом највероватније је последица разградње ових полисахарида до олиго- и моносахарида у присуству реактивних врста. Пикови на око  $1\ 231$  и  $1\ 513\ \text{cm}^{-1}$  односе се на присуство лигнина у узорцима. Интензитет ових пикова најмањи је у узорку  $H_2O\ 60'$ , у коме је уједно постигнут и највећи степен делигнификације. Значајно уклањање лигнина потврђује и смањење интензитета пика на око  $1\ 669\ \text{cm}^{-1}$ , карактеристичног за синапил и кониферил алкохол [338]. Деформације С-Н везе у ксилану се уочавају на око  $1\ 467\ \text{cm}^{-1}$  [339]. Смањење интензитета овог пика указује на разградњу хемицелулозе применом нетермалне плазме, што је претходно потврђено и FTIR спектроскопијом.

Нешто ефикаснија делигнификација лигноцелулозне биомасе применом нетермалне плазме у воденом медијуму остварена је третманом пивског тропа у DBD плазма реактору, где је након 15 min уклоњено око 36% лигнина, у присуству киселог и базног катализатора. Ензимском хидролизом третиране биомасе принос глукозе је повећан 2,14 пута у односу на сирову биомасу [12]. Наведени резултати указују на повећање ефикасности третмана плазмом уз присуство једињења која ће катализовати разградњу лигноцелулозе У циљу постизања значајно вишег степена делигнификације и/или скраћења дужине третмана, уз минималну употребу штетних реагенаса разматрани су неконвенционални комбиновани третмани плазмом.

#### 4.4. Комбиновани нетермална плазма/Фентон третман

Разградња лигноцелулозне биомасе у природи се одиграва по механизму Фентонове реакције. Гљиве изазивачи белог труљења синтетишу ензиме који су одговорни за делигнификацију. Иако природан и веома једноставан, овај процес веома дуго траје, што ограничава његову примену у биорафинеријским поступцима. У оквиру ове дисертације коришћен је Фентонов реагенс за третман биомасе, како би се испитала могућност развијања биомиметичког поступка делигнификације. Третман је потпомогнут нетермалном плазмом, чиме је омогућено *in situ* стварање водоник пероксида неопходног за континуално одвијање Фентонове реакције. Истовремено, UV зрачење које потиче од плазме имало је улогу катализатора процеса, без додатних финансијских улагања која развој фото-Фентон третмана захтева [340].

Могућност примене Фентоновог реагенса за делигнификацију кукурузне стабљике испитивана је са више аспеката. Праћен је утицај примене Фентон третмана (*F*) и комбинованог нетермална плазма/Фентон третмана, при чему је узет у обзир и редослед примењених третмана. Један сет узорака је најпре третиран плазмом и потом је додата со гвожђа у узорак (*P*). Други сет узорака је подразумевао додавање соли гвожђа, а затим је уследио третман плазмом (*Fe*). Утицај дужине трајања третмана је испитиван варирањем дужине третмана плазмом током 10 min, 20 min и 30 min (*P 10'*, *P 20'*, *P 30'*, односно *Fe 10'*, *Fe 20'*, *Fe 30'*). Додатно, испитан је и утицај извора и типа јона гвожђа на ефикасност третмана тако што су за припрему Фентоновог реагенса коришћени јони  $Fe^{2+}$  (као  $FeSO_4$ ) и јони  $Fe^{3+}$  (као  $FeCl_3$ ). Однос соли гвожђа и водоник пероксида из којих је Фентонов реагенс сачињен био је 1:5, односно 1:25. Варирано је и време инкубације узорака након третмана плазмом – 24 h и 48 h. Степен делигнификације третираних узорака остварен након 24-часовне инкубације приказан је на слици 4.10.



Слика 4.10. Степен делигнификације биомасе третиране Фентон третманом (*F*) и комбинованим нетермална плазма/Фентон третманом уз додатак соли гвожђа пре (*Fe*), односно након третмана плазмом (*P*) током 10, 20 и 30 min. Шрафирани су узорци који су због највишег степена делигнификације одабрани као најпогоднији за даљу карактеризацију.

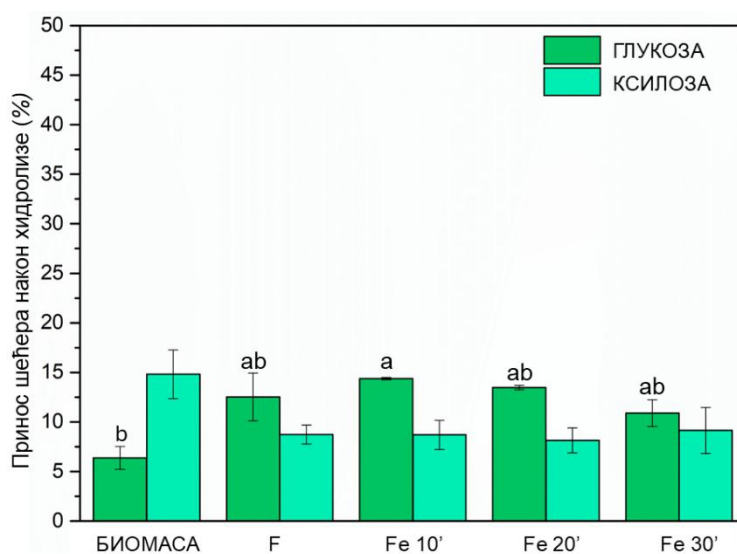
Када је Фентонов реагенс припремљен употребом  $\text{FeCl}_3$  и водоник пероксида у односу 1:5, делигнификација није уочена у узорцима третираним само Фентоновим реагенсом ( $F$ ) и узорцима третираним плазмом пре додавања соли гвожђа ( $P$  10'-30'). Негативне вредности степена делигнификације ових узорака указују на то да је током поменутих третмана дошло до разградње угљено-хидратне компоненте, доводећи до привидног повећања садржаја резидуалног лигнина у узорцима. Када је додаток соли гвожђа претходио третману плазмом ( $Fe$  10'-30'), остварена је делигнификација од  $10,1\% \pm 3,2\%$ ,  $14,1\% \pm 7,1\%$ , односно  $21,5\% \pm 8,2\%$  за узорке третиране 10 min, 20 min и 30 min, респективно. Међутим, када је Фентонов реагенс припремљен употребом исте соли и водоник пероксида у односу 1:25, делигнификација је примећена у свим узорцима, указујући на значај концентрације водоник пероксида [341]. Наиме, водоник пероксид се у присуству гвожђа може разградити до воде и кисеоника (једначина 2.21), што доводи до прекидања Фентон реакције. Како би се овај проблем превазишао, неопходно је повећати концентрацију водоник пероксида. Прекомерне концентрације водоник пероксида могу довести до разградње угљено-хидратне компоненте, што је неповољно за њену даљу валоризацију, те је неопходно вршити континуално додавање водоник пероксида [342], чиме се истиче значај укључивања плазме у овај третман. Осим олакшаног контролисања концентрације водоник пероксида, третман плазмом је допринео и повећању степена делигнификације третиране биомасе. Додатком гвожђа у реакциону смешу непосредно пре третмана плазмом Фентон реакција је већ започета. Излагањем ове смеше плазми поспешено је стварање реактивних врста које учествују у Фентоновој реакцији (једначине 2.4-2.13), што је допринело ефикаснијој разградњи биомасе. Укључивањем плазме у третман, степен делигнификације је порастао за 9% до 25% у односу на третман само Фентоновим реагенсом. Највећи степен делигнификације од  $53,5\% \pm 8,6\%$  постигнут је при најдужем излагању узорка плазми, у трајању од 30 min ( $Fe$  30'). Позитиван утицај комбиновања Фентон третмана са другим третманима на делигнификацију уочили су и Wu и сар. (2022) [343]. Сукцесивним третманом бамбуса најпре етанолом, а потом и Фентоновим реагенсом довео је до уклањања око 32% лигнина, док након третмана бамбуса само Фентоновим реагенсом није примећена делигнификација [340]. Након утврђивања услова за уклањање највеће количине лигнина, испитана је и могућност повећања ефикасности продужавањем третмана нетермалном плазмом на 60 min. Међутим, до повећања степена делигнификације није дошло, највероватније услед прекомерне концентрације водоник пероксида, којом је спречено редуковање јона гвожђа и настанак нових концентрација хидроксил радикала [344]. Фентон-сличан третман отпада из производње кафе потврдио је да се значајан степен делигнификације може остварити и при краћим излагањима биомасе плазми [206]. У овој студији, Ravindran и сар. (2017) су третманом биомасе у разблаженој сумпорној киселини у DBD реактору, уз  $\text{FeCl}_3$  као катализатор, уклонили чак 40% лигнина за свега 6 min [206]. Међутим, како у поменутој студији нису извођени експерименти без третмана плазмом или у одсуству катализатора, остаје неразјашњено да ли су делигнификацији допринели плазма и елементи Фентоновог реагенса, или је сама киселина имала кључну улогу у уклањању лигнина.

Применом  $\text{FeSO}_4$  као извора јона гвожђа није уочен јасан тренд делигнификације ни када је Фентонов реагенс припреман у односу 1:5, ни у односу 1:25. Варирањем процесних параметара нису остварене статистички значајне разлике. Редослед примењених третмана није утицао на делигнификацију биомасе, док је Фентонов реагенс припремљен у односу 1:25 дао нешто боље резултате. Највиши степен делигнификације од  $25,8\% \pm 5,8\%$  остварен је при 20-минутном комбинованом плазма/Фентон третману припремљеном у односу 1:25, при чему је со гвожђа додата пре третмана нетермалном плазмом ( $Fe$  30'). У узорку третираном плазмом током 20 min, када је со гвожђа додата након третмана плазмом у односу 1:5 ( $P$  20') дошло је до разградње угљено-хидратне компоненте, уочене као привидног повећања садржаја резидуалног лигнина, односно негативног степена делигнификације. На основу кинетике Фентон реакције (једначина 2.4) и Фентон-сличне реакције (једначина 2.5) очекивано је да ће

$\text{FeSO}_4$  бити бољи извор јона гвожђа, јер је константа брзине реакције са  $\text{Fe}^{2+}$  јонима већа од константе брзине реакције са  $\text{Fe}^{3+}$  за четири реда величине. Међутим, већа ефикасност третмана са  $\text{FeCl}_3$  као извором јона гвожђа највероватније потиче од јона хлорида. Како води порекло од електронегативног елемента, јон хлорида је нуклеофилни реагенс и уједно веома добар акцептор водоника, што га чини погодним за конверзију и/или разградњу лигноцелулозне биомасе. Ова конверзија се заснива на кидању  $\beta$ -О-4 и 4-О-5 етарских веза присутних у молекулу лигнина, као и С-О веза присутних у целулози [345]. Ефикаснија делигнификација у присуству хлоридних јона потврђена је и након третмана пиринчане стабљике, било је да је реакција иницирана додатком  $\text{Fe}^{2+}$  или  $\text{Fe}^{3+}$  јона [143].

Продужавање периода инкубације узорака са 24 h на 48 h није допринело ефикаснијој делигнификације. У свим узорцима је уочен мањи степен делигнификације у односу на 24-часовну инкубацију. Мањи степен делигнификације је највероватније последица разградње угљено-хидратне компоненте. Фентон и комбиновани плазма/Фентон третмани се одигравају у киселој средини (pH~3). Дуже излагање угљено-хидратне компоненте киселом реагенсу при благо повишеној температури погодновало је хидролизати једног дела шећера, што је довело до привидног повећања степена делигнификације третираних узорака.

На основу остварених резултата, узорци третиран комбинованим плазма/Фентон третманом, при чему је Фентонов реагенс припремљен коришћењем  $\text{FeCl}_3$  и водоник пероксида у односу 1:25 и со гвожђа је додата пре третмана плазмом ( $\text{Fe } 10'$ - $30'$ ), одабрани су као узорци у којима је третман био најефикаснији и све даље анализе су вршене на њима. Узорак третиран само Фентоновим реагенсом задржан је као контролни узорак. Одабрани узорци су подвргнути ензимској хидролизати током 48 h, како би се испитала могућност примене ових третмана за повећање доступности угљено-хидратне компоненте ензимима. Приноси хексоза, изражених на глукозу, и пентоза, изражених на ксилозу, приказани су на слици 4.11.



Слика 4.11. Принос шећера након 48-часовне хидролизе сирове биомасе, биомасе третиране Фентон третманом ( $F$ ) и комбинованим плазма/Фентон третманом током 10, 20 и 30 min ( $Fe 10'$ ,  $Fe 20'$ ,  $Fe 30'$ )

Смањење концентрације ксилозе у хидролизатима третиране биомасе у односу на сирову биомасу указује на то да је током примењених третмана дошло до разградње хемичелулозне фракције. Сви третмани су били подједнако ефикасни у уклањању хемичелулозе, што потврђује и одсуство статистички значајних разлика у приносима ксилозе оствареним након хидролизе третиране биомасе. Пораст концентрације глукозе након примењених третмана примећен је у свим узорцима, што указује на ефикасност ових третмана у повећању доступности угљено-хидратне, вероватно доминантно целулозне, компоненте ензимима. Највећи пораст је остварен у узорку третираном комбинованим нетермална

плазма/Фентон третманом током 10 min, при чему је принос глукозе био 2,25 пута виши у односу на сирову биомасу. Остварени принос глукозе након ензимске хидролизе није у складу са највећим постигнутим степеном делигнификације, што указује на то да и други фактори утичу на хидролизу. При дужим третманима биомасе нетермалном плазмом највероватније је дошло до структурних промена које би могле да представљају физичку препреку ензимима. Такође, примењени третмани могу утицати на облик и величину пора на површини узорака, а самим тим и на способност ензима да кроз ове поре прође и ступи у интеракцију са супстратом. Иако разлике у оствареним приносима глукозе након примењених третмана нису статистички значајне, третирану узорци су окарактерисани са аспекта промена у текстури, морфологији и структури, како би се утврдио разлог неслагања степена делигнификације и приноса шећера.

Одређивање промена у текстури третиране биомасе заснива се на примени порозиметрије са интрузијом живе, при чему се интрузија врши у два циклуса. Два циклуса интрузије су неопходна како би се утврдио допринос шупљина и интерчестичних простора карактеристичних за прашкасте узорке и тиме добили што поузданији резултати [346]. У првом циклусу жива испуњава интерчестичне просторе, да би у другом циклусу интрузије била утиснута само у доступне поре биомасе, односно интрачестичне просторе. Вредности параметара који описују текстурална својства биомасе добијених мерењем након првог и другог циклуса интрузије приказани су у табели 4.3.

Табела 4.3. Текстурална својства сирове биомасе, биомасе третиране комбинованим плазма/вода третманом током 30 min ( $H_2O$  30'), Фентон третманом ( $F$ ) и комбинованим плазма/Фентон третманом током 10 min, 20 min и 30 min ( $Fe$  10',  $Fe$  20',  $Fe$  30'), одређена применом порозиметрије са интрузијом живе (MIP)

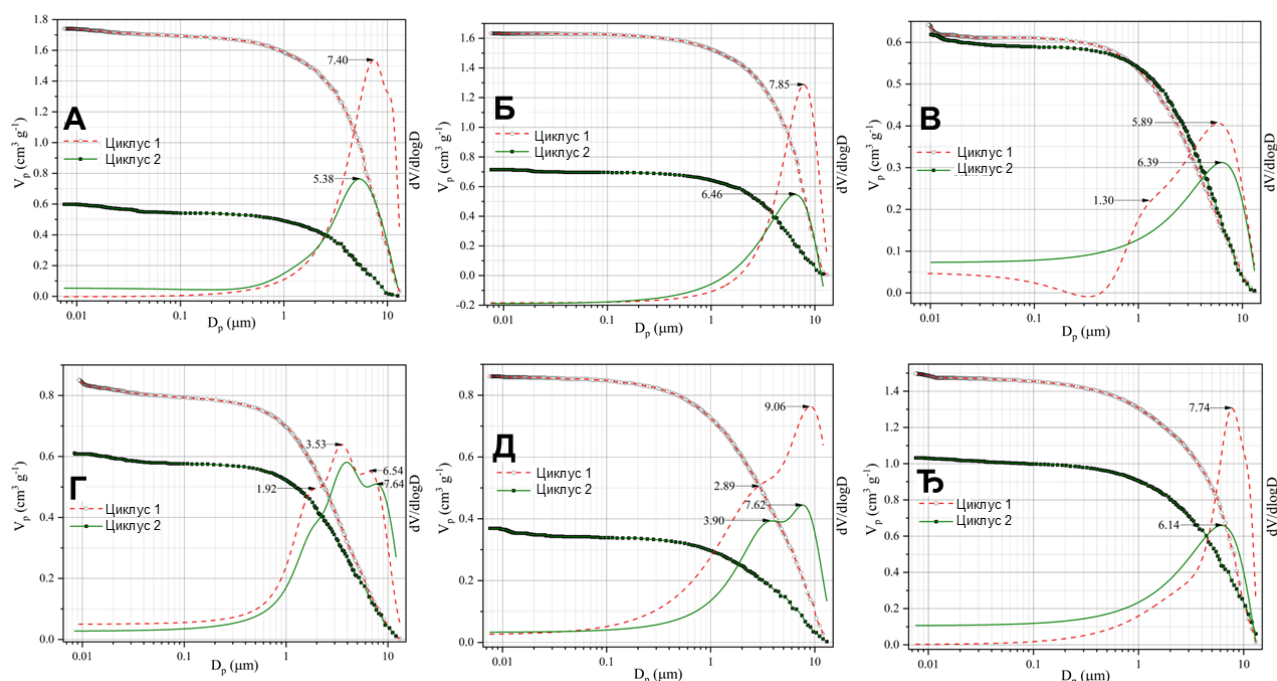
Узорак	Циклус	$^aV_{tot}$ ( $cm^3 g^{-1}$ )	$^bS_{Hg}$ ( $m^2 g^{-1}$ )	$^cD_{av}$ ( $\mu m$ )	$^dBD$ ( $g cm^{-3}$ )	$^eP$ (%)
Биомаса	I	1,74	11,67	9,78	0,41	71,36
	II	0,60	11,44	7,85	0,41	24,55
$H_2O$ 30'	I	1,63	3,62	7,85	0,47	76,74
	II	0,71	5,17	7,23	0,47	33,57
$F$	I	0,64	11,89	5,05	0,84	53,90
	II	0,62	8,22	5,05	0,84	51,99
$Fe$ 10'	I	0,85	15,67	3,25	0,77	65,46
	II	0,61	8,46	5,81	0,77	47,04
$Fe$ 20'	I	0,86	4,47	9,00	0,71	61,14
	II	0,37	8,73	5,05	0,71	26,20
$Fe$ 30'	I	1,50	14,59	9,78	0,51	76,37
	II	1,03	8,08	9,78	0,51	52,63

<sup>a</sup> Укупна специфична запремина пора одређена на притиску од 200 МПа; <sup>b</sup> Специфична површина пора; <sup>c</sup> Просечни пречник пора; <sup>d</sup> Стварна густина пора на атмосферском притиску; <sup>e</sup> Порозност.

Разлике у вредностима мерења након првог, односно другог циклуса, потичу од интерчестичних простора. Стварне вредности наведених параметара за сваки од узорака налазе се између две измерене вредности, али ближе вредностима након другог циклуса интрузије. Сличније вредности у мерењима након првог и другог циклуса интрузије указују на већу стабилност пора. Највеће разлике између два циклуса су запажене у вредностима укупне специфичне запремине пора и порозности како сирове, тако и третиране биомасе. Највеће одступање примећено је у сировој биомаси (65,5%), док су вредности након оба циклуса интрузије биле најприближније у узорку третираном само Фентоновим реагенсом (3,1%). Када је реч о узорцима третираним комбинованим нетермална плазма/Фентон третманом, разлике у вредностима између два циклуса износиле су 28,2%, 56,8% и 31,3% за узорке третиране 10 min ( $Fe$  10'), 20 min ( $Fe$  20') и 30 min ( $Fe$  30'), респективно. Међутим, поменуте разлике нису само последица постојања интерчестичних простора. Разликама у вредностима измерених

параметара доприноси и тзв. ефекат „бочице за мастило“ (енгл. *ink-bottle effect*), који утиче на поузданост одређивања величине пора. Наиме, током првог циклуса интрузије жива се утискује у поре услед повећања притиска. Уколико поре имају облик бочице за мастило, једном утиснута жива посредством повишеног притиска неће моћи да изађе из поре током растерећења система. Жива остаје иреверзибилно „заробљена“ у порама, чиме оне постају недоступне за наредни циклус интрузије, што може довести до неслагања у измереним вредностима након првог и другог циклуса интрузије [347].

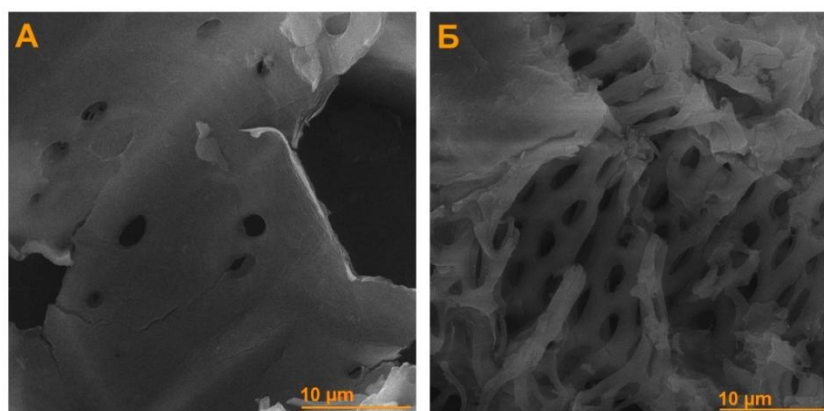
Кумулативне криве живе заробљене у порама и криве расподеле величине пора сирове и третиране биомасе добијене порозиметријом са интрузијом живе приказане су на слици 4.12. На основу добијених кривих може се уочити макропорозна природа испитиваних узорака, што је нарочито изражено у сировој биомаси и узорцима *Fe 20'* и *Fe 30'*, код којих су након другог циклуса интрузије забележене ниже вредности пречника пора. Вредности пречника пора измерене након другог циклуса биле су у опсегу од 1,30  $\mu\text{m}$  до 9,06  $\mu\text{m}$ .



Слика 4.12. Кумулативне криве живе заробљене у порама и криве расподеле величине пора након порозиметрије са интрузијом живе у два циклуса за сирову биомасу (А), биомасу третирану комбинованим плазма/вода третманом током 30 min (Б), Фентон третманом (Б) и комбинованим плазма/Фентон третманом током 10 min (Г), 20 min (Д) и 30 min (Е)

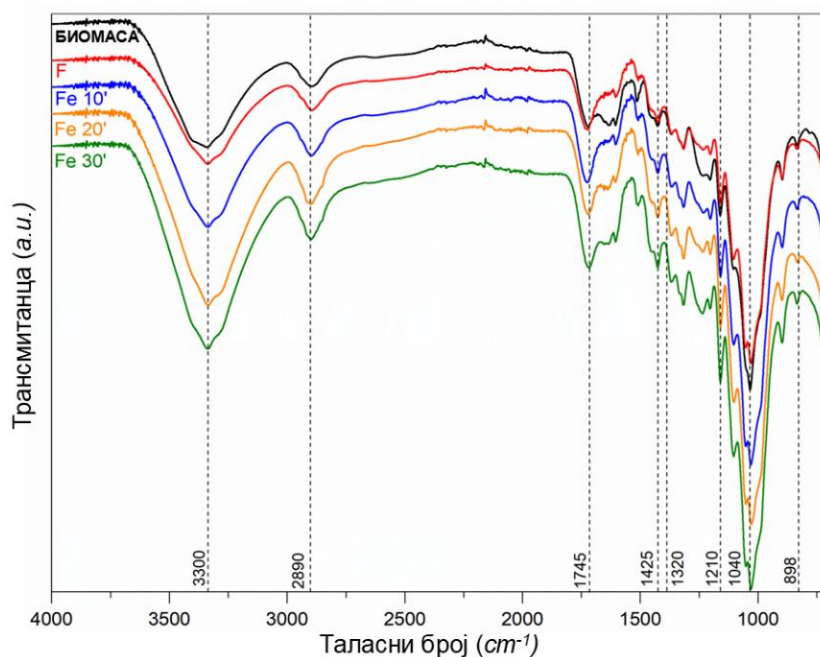
Мултимодални карактер је примећен код свих узорака, са изузетком сирове биомасе и узорка *Fe 30'*. Мултимодални карактер кривих указује на неуниформну структуру макропора присутних у третираној биомаси. Са друге стране, криве у случају сирове биомасе и узорка *Fe 30'* карактерише мономодални облик након оба циклуса интрузије, са величином пора фиксираном на 7,40  $\mu\text{m}$ /5,38  $\mu\text{m}$  и 7,74  $\mu\text{m}$ /6,14  $\mu\text{m}$ , респективно. Резултати из табеле 4.3. указују на то да узорак *Fe 30'* одликује два пута већа порозност од сирове биомасе, нарочито након другог циклуса интрузије. Осим значајно веће порозности у односу на сирову биомасу, узорак *Fe 30'* је стабилнији и распоред пора је униформнији у односу на узорке добијене након краћих третмана плазмом (*Fe 10'* и *Fe 20'*), што сугерише на погодност овако третиране биомасе за дифузију великих органских молекула, попут ензима током ензимске хидролизе. Међутим, принос хексоза ослобођених након 48-часовне ензимске хидролизе био је највиши у узорку подвргнутом третману плазмом током само 10 min (*Fe 10'*), затим у узорку третираном 20 min (*Fe 20'*) и на крају узорку третираном током 30 min (*Fe 30'*) (слика 4.11.). Ово може бити последица промене структуре и морфологије површине пора са продужавањем дужине третмана плазмом. Осим текстуралних својстава третиране биомасе, на ефикасност ензимске

хидролизе утичу и промене у морфологији, као и модификације површине саме биомасе. Скенирајућа електронска микроскопија је коришћена за уочавање промена у морфологији узорка након 30-минутног плазма/Фентон третмана у односу на сирову биомасу. Добијене микрографије приказане су на слици 4.13.



Слика 4.13. SEM микрографија сирове биомасе (А) и биомасе третиране комбинованим плазма/Фентон третманом током 30 min (Б)

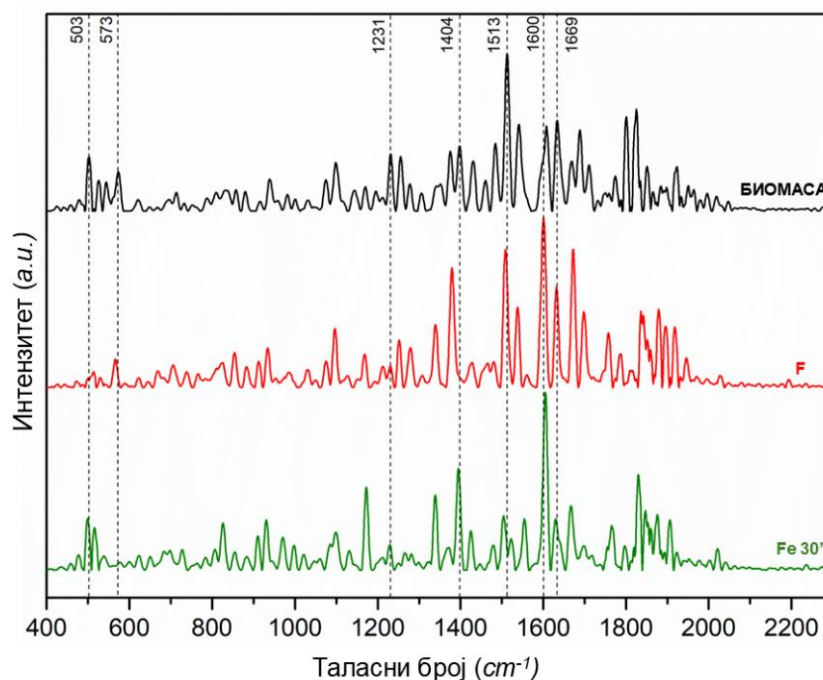
Током комбинованог плазма/Фентон третмана дошло је до значајног повећања порозности биомасе. Истовремено су повећани и величина и број новонасталих пора. За разлику од сирове биомасе, распоред пора у третираној биомаси је униформнији, што је потврђено и применом порозиметрије са интрузијом живе. Осим порозности, на механизам ензимске хидролизе могу утицати и функционалне групе које се ослобађају услед кидања веза у присуству нетермалне плазме. Како би се утврдиле промене у структури биомасе применом различитих третмана, третирана биомаса је анализирана применом FTIR и Раман спектроскопије. FTIR спектри сирове биомасе и биомасе третиране Фентоновим реагенсом или комбинованим плазма/Фентон третманом приказани су на слици 4.14.



Слика 4.14. FTIR спектри сирове биомасе, биомасе третиране Фентон третманом (F) и комбинованим плазма/Фентон третманом током 10 min (Fe 10'), 20 min (Fe 20') и 30 min (Fe 30')

Промена облика и повећање интензитета пика на око  $3330\text{ cm}^{-1}$  указује да је применом комбинованог плазма/Фентон третмана дошло до слабљења и раскидања водоничних веза,

нарочито у узорку третираном 30 min. У овом узорку је вредност интензитета водоничних веза (НВІ) најнижа и износила је 0,95, у поређењу са сировом биомасом у којој ова вредност износи 1,01. Осим водоничних, применом третмана су ослабљене и  $\beta$ -О-4 везе, које су карактеристичне за лигнин, а на спектру се уочавају као пик на око  $1\ 505\ \text{cm}^{-1}$  [348]. Изражен пик на око  $1\ 040\ \text{cm}^{-1}$  потиче од хемицелулозе и потврђује да је она доминантно изграђена од ксилана [334]. Интензитет другог пика карактеристичног за хемицелулозу на око  $1\ 745\ \text{cm}^{-1}$  благо опада у третираним узорцима, сугеришући да је током третмана дошло до њене делимичне разградње [333]. Ово потврђује и принос ксилозе након ензимске хидролизе, који је за око 42% мањи у хидролизатима третираних узорка у односу на сирову биомасу. Пик на око  $1\ 320\ \text{cm}^{-1}$  односи се на сирингил јединицу лигнина, а пик на око  $1\ 210\ \text{cm}^{-1}$  се односи на гвајакил јединицу [335]. Пик на око  $898\ \text{cm}^{-1}$  потиче од  $\beta$ -гликозидних веза којима су међусобно повезане шећерне јединице [349]. Интензитет овог пика расте са продужавањем третмана плазмом, док је у случају третмана само Фентоновим реагенсом овај пик потпуно нестао, сугеришући да је током овог третмана дошло и до разградње угљено-хидратне компоненте. Ове промене сугеришу да је укључивањем плазме у третман ограничена разградња целулозе и чиме је обезбеђено остваривање и до 2,25 пута виших приноса глукозе након ензимске хидролизе, што је посебно важно за примену у биорафинерији. Сличан феномен уочен је и биомиметичким третманом пиринчане стабљике, заснованим на комбинацији Фентоновог реагенса и биолошког третмана помоћу *Cupriavidus basilensis* В-8 [350]. Ово би могло да објасни и већи принос глукозе након хидролизе *Fe 10'* у односу на *F*, иако је текстура ова два узорка била готово идентична. Осим FTIR-а, разлике у структури третиране у односу на сирову биомасу испитиване су и применом Раман спектроскопије. Раман спектри сирове и третиране биомасе приказани су на слици 4.15.

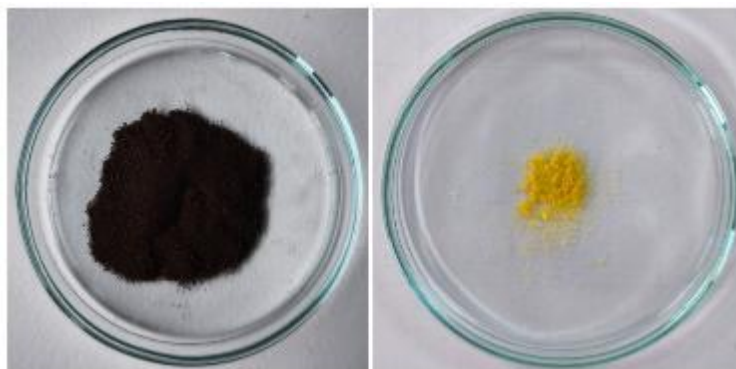


Слика 4.15. Раман спектри сирове биомасе, биомасе третиране Фентон третманом (*F*) и комбинованим плазма/Фентон третманом током 30 min (*Fe 30'*)

Присуство нецелулозних структурних полисахарида одликују пикови на око  $503\ \text{cm}^{-1}$  и  $573\ \text{cm}^{-1}$  [337]. Значајно смањење интензитета ових пикова у *F* указује на то да су ови полисахариди разграђени током третмана биомасе Фентоновим реагенсом. Смањење интензитета пикова на око  $1\ 231\ \text{cm}^{-1}$  и  $1\ 513\ \text{cm}^{-1}$ , који потичу од деформације прстена у молекулу лигнина [338], примећено је у биомаси третираној Фентоновим реагенсом, док су ови пикови готово нестали након комбинованог плазма/Фентон третмана, потврђујући делигнификацију третиране биомасе. Нешто интензивнији пикови на око  $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$  и  $1\ 669\ \text{cm}^{-1}$

$\text{cm}^{-1}$  у третираној биомаси у односу на сирову биомасу, који потичу од вибрација ароматичног скелета и истезања веза у синапил и кониферил алкохолу, указују на присуство резидуалног лигнина и након третмана [338]. Већи интензитет пика на око  $1\,404\text{ cm}^{-1}$ , који се односи на целулозу [351], у *Fe 30'* у односу на *F* потврђује да је применом плазме спречена разградња целулозе, што је претходно уочено и помоћу FTIR спектроскопије.

Након издвајања третиране биомасе, из течне фракције која заостаје након третмана изоловане су лигнинска и хемицелулозна фракција, према протоколу описаном у одељку 3.5.2. Изоловану лигнинску фракцију карактерише јарко жута боја која потиче од гвожђа везаног за лигнин. Велики број  $-\text{COOH}$  група присутних у лигнину одговоран је за адсорпцију гвожђа на његовој површини [352]. За разлику од целулозне фракције, испирањем лигнинске фракције оксалном киселином није било могуће уклонити адсорбовано гвожђе, чиме је ограничена могућност искоришћења ове фракције. Да би лигнин могао да се користи у различитим козметичким и фармацеутским формулацијама, или у активним паковањима хране, потребно је да задовољава одређене критеријуме, укључујући органолептичка својства [353,354]. Недовољна пречишћеност изоловане лигнинске фракције и присуство адсорбованог гвожђа га сврставају у групу техничких лигнина, уз крафт лигнин. Изглед лигнинске фракције изоловане након комбинованог плазма/Фентон третмана и комерцијалног крафт лигнина приказан је на слици 4.16.



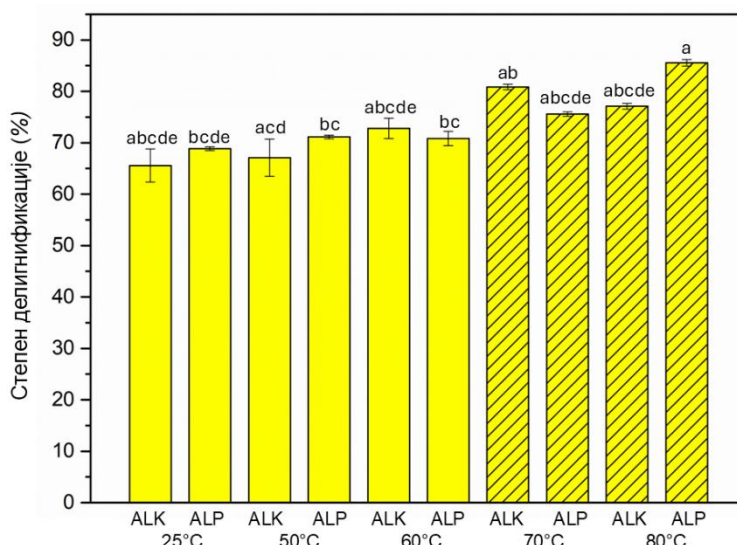
Слика 4.16. Изглед комерцијалног крафт лигнина (лево) и лигнинске фракције изоловане након комбинованог нетермална плазма/Фентон третмана током 30 min (десно)

Хемицелулозна фракција је окарактерисана са аспекта пречишћености од лигнина. Применом методе са ацетил бромидом утврђено је да је садржај резидуалног лигнина у изолованој хемицелулозној фракцији износио  $12,4\% \pm 1,7\%$ , што би могло да објасни и ниске приносе изоловане лигнинске фракције. Како би се уклонио лигнин из хемицелулозне фракције неопходно је увести нове кораке пречишћавања током раздвајања фракција. Међутим, како је принос ове фракције био низак, а њен садржај хетероген и несталан, даља карактеризација и пречишћавање нису вршени. Након третмана биомасе применом комбинованог плазма третмана у киселој средини, испитане су могућности третмана биомасе у базној средини.

#### 4.5. Комбиновани нетермална плазма/алкални третман

Алкални третман је заступљен у индустрији производње папира. Применом овог третмана долази до делигнификације и делимичног уклањања хемицелулозе, при  $\text{pH} \sim 12$  најчешће у присуству натријум хидроксида [355]. Да би се постигао висок степен делигнификације, овај третман се изводи на температурама вишим од  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , често у трајању од неколико часова. У оквиру ове дисертације, третман биомасе алкалним раствором водоник пероксида комбинован је са нетермалном плазмом како би се испитала могућност унапређења конвенционалног алкалног третмана. Циљ развијања овог третмана је било постизање ефикасне делигнификације на умерено повишеним температурама (од  $50\text{ }^\circ\text{C}$  до  $80\text{ }^\circ\text{C}$ ) и у краћем временском периоду, како би третман постао одрживији. Да би се утврдио допринос

плазме при различитим температурама, паралелно су извођени алкални (*ALK 25 °C*, *ALK 50 °C*, *ALK 60 °C*, *ALK 70 °C* и *ALK 80 °C*) и комбиновани плазма/алкални третман (*ALP 25 °C*, *ALP 50 °C*, *ALP 60 °C*, *ALP 70 °C* и *ALP 80 °C*). Остварени степен делигнификације у третираним узорцима приказан је на слици 4.17.



Слика 4.17. Степен делигнификације биомасе третиране алкалним третманом на различитим температурама (*ALK 25 °C-80 °C*) и биомасе третиране комбинованим плазма/алкалним третманом на различитим температурама (*ALP 25 °C-80 °C*). Шрафирани су узорци који су због највишег степена делигнификације одабрани као најпогоднији за даљу карактеризацију.

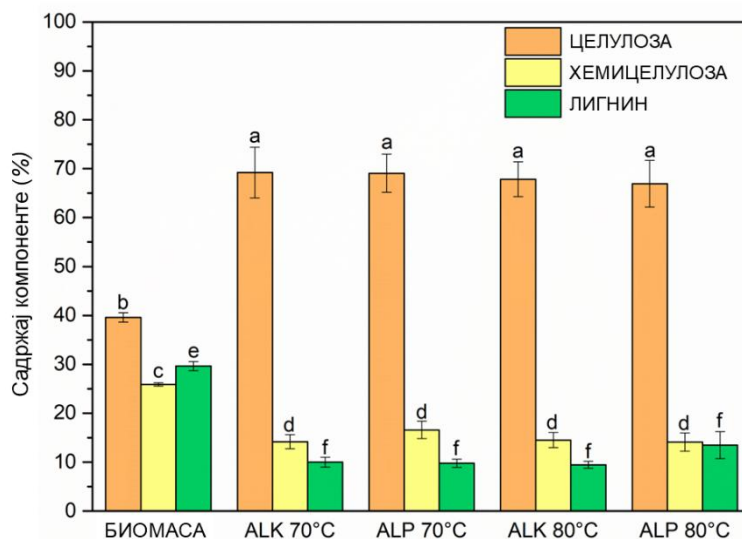
У свим узорцима је остварена значајна делигнификација, са уклањањем више од 60% лигнина. Ефикасност третмана је расла са повећањем температуре, при чему је највише лигнина, чак 86,0% ± 2,2%, уклоњено применом комбинованог плазма/алкалног третмана на 80 °C (*ALP 80 °C*). Ефикасно уклањање лигнина резултат је одабира одговарајућег алкалног медијума за третман биомасе. Механизам делигнификације применом алкалног третмана заснива се на деполимеризацији и растварању лигнина, праћеног сапонификацијом интермолекулских естарских веза у молекулу хемицелулозе, што значајно доприноси њеној разградњи [356]. Када се за третман користи алкални раствор водоник пероксида у јако базној средини (pH ~ 11,5-11,6) поспешује се стварање хидропероксил анјона (HOO<sup>-</sup>), у реверзибилној реакцији [357]:



Због своје високе реактивности, овај неселективни анјон представља једну од најефикаснијих реактивних врста за разградњу лигноцелулозе. Деградациона моћ хидропероксил анјона може се повећати комбиновањем алкалног третмана са плазмом, која доприноси стварању овог анјона у бројним реакцијама између реактивних врста (табела 2.5.). Хидропероксил анјон, заједно са другим реактивним врстама насталим у третману плазмом, попут хидроксил радикала и водоник пероксида, омогућава ефикасну делигнификацију третиране биомасе, уз истовремену оксидацију лигнина [358], о чему ће бити речи касније. Детаљном претрагом литературе пронађена је само једна студија која је разматрала комбиновање плазме и алкалног третмана. Miranda и сар. (2019) су испитивали могућност употребе смеше натријум карбоната и натријум хидроксида, различитих pH вредности, у третману шећерне багасе плазмом [203]. Поменути третман је био ефикасан само при pH 12, када је уклоњено око 53% лигнина, док при нижим pH вредностима није дошло до делигнификације [203]. Степен делигнификације сличан оствареном у овој дисертацији потврђен је и применом других неконвенционалних третмана у алкалном медијуму. Синергистичким деловањем алкалног раствора водоник пероксида и накнадно примењене јонске течности уклоњено је 85% лигнина из кукурузне стабљике [315], док је експлозијом воденом паром, праћеном третманом стабљике натријум

хидроксидом остварен степен делигнификације од 72% [359]. Поменути третмани су извођени на умерено високим температурама (60 °C до 100 °C), али су трајали дуже од 24 h, док је третман развијен у овој дисертацији трајао свега 130 min. Осим дужине третмана, на ефикасност делигнификације се може утицати и правилним одабиром температуре. У студији коју су спровели Mierzejewska и сар. (2018), излагањем кукурузне стабљике алкалном раствору водоник пероксида 3,5 h на 50 °C, уклоњено је 69% лигнина [360]. Сличан степен делигнификације је потврђен и применом третмана развијеног у овој дисертацији на 50 °C (слика 4.17). Међутим, краткотрајно излагање узорака повишеним температурама (70 °C до 80 °C) довело је до додатног повећања степена делигнификације, за 10% до 15%, у односу на третман на 50 °C. Применом плазме се може значајно утицати на дужину и одрживост третмана са енергетског и економског аспекта, али су такође значајни и аспекти хемијско-физичких карактеристика свих заосталих фракција.

Како је садржај лигнина био најнижи у узорцима третираним алкалним (*ALK*) и комбинованим плазма/алкалним (*ALP*) третманом на 70 °C, односно 80 °C, ови узорци су одабрани за даљу карактеризацију и валоризацију. Најпре је одређен садржај компоненти лигноцелулозе у сировој и третираној биомаси применом NREL протокола. Применом овог протокола одређује се садржај лигнина, као и шећера насталих хидролизом целулозе и хемицелулозе присутних у биомаси. Како су од шећера били детектовани само глукоза и ксилоза, садржаји ових шећера се могу користити за процену садржаја целулозе, односно хемицелулозе [302]. Садржај лигнина и структурних угљених хидрата приказан је на слици 4.18.

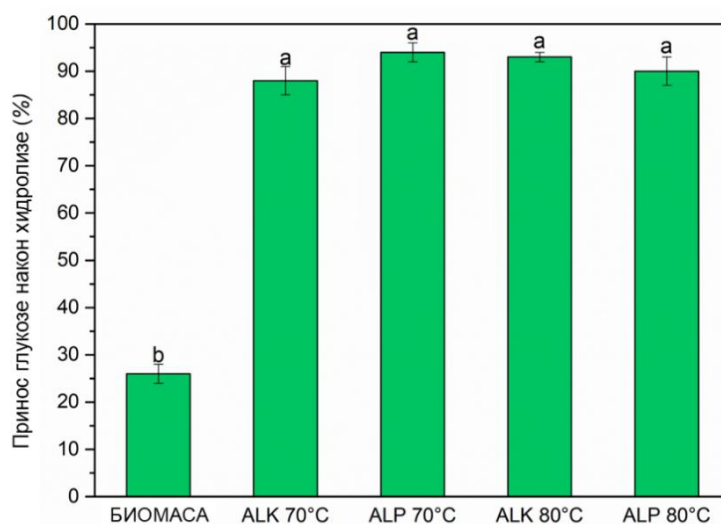


Слика 4.18. Садржај лигнина и структурних угљених хидрата у сировој биомаси, биомаси третираној алкалним третманом на 70 °C, односно 80 °C (*ALK* 70 °C и *ALK* 80 °C) и комбинованим плазма/алкалним третманом на 70°C, односно 80°C (*ALP* 70 °C и *ALP* 80 °C)

Након свих примењених третмана примећено је смањење садржаја хемицелулозе, које указује на њену делимичну разградњу током третмана. Ово потврђује и присуство олигосахарида и глукуронске киселине који потичу од хемицелулозе, а који су детектовани HPLC анализом у течној фракцији заосталој након третмана. Просечно око 57% хемицелулозе је уклоњено током третмана биомасе. Осим хемицелулозе, током третмана је уклоњена и значајна количина лигнина. Садржај лигнина растворљивог у киселинама је износио од 1,82 до 1,89% након свих примењених третмана. Готово непромењени садржај лигнина растворљивог у киселинама сугерише да примењени третмани нису утицали на компоненту лигнина растворног у киселинама, већ су довели до промене у његовој структури и деполимеризације. Ово је и потврђено анализом структурних промена изолованих лигнинских фракција, које ће касније бити детаљно анализирани на основу FTIR спектра. Сличан феномен

уочили су и Yu и сар. (2010) [361]. Уклањање хемицелулозе и лигнина из биомасе резултовало је повећањем релативног садржаја целулозе у третираним узорцима за чак 30%. Захваљујући високом садржају целулозе (око 70%), очекивано је да се третирана биомаса може користити као супстрат у ферментационим процесима за производњу секундарних метаболита, попут биоетанола, млечне киселине и микробних липида који се могу користити за производњу биодизела [362,363], уколико се може остварити адекватна разградња доступне целулозе из третиране биомасе.

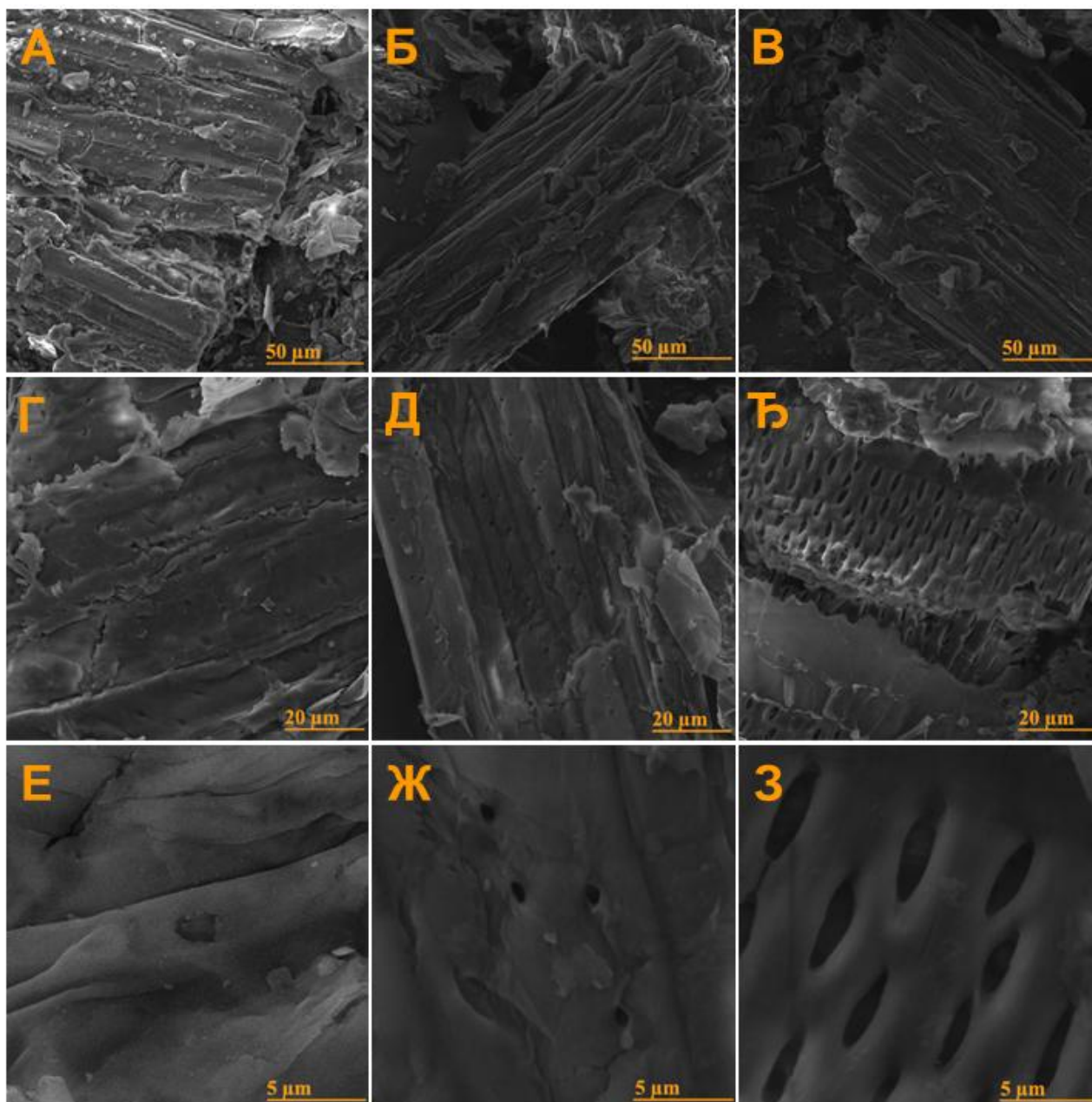
Третирана биомаса је подвргнута ензимској хидролизи током 48 h, у циљу анализе доступности угљено-хидратне компоненте ензимима и даљег искоришћења у биотехнолошких поступцима. Принос глукозе у хидролизатима, добијен применом HPLC анализе, приказан је на слици 4.19.



Слика 4.19. Принос глукозе након 48-часовне хидролизе сирове биомасе, биомасе третиране алкалним третманом на 70 °C, односно 80 °C (*ALK 70 °C* и *ALK 80 °C*) и комбинованим плазма/алкалним третманом на 70 °C, односно 80 °C (*ALP 70 °C* и *ALP 80 °C*)

Након 48-часовне хидролизе третиране биомасе остварени су значајно виши приноси глукозе у односу на сирову биомасу. Принос глукозе у хидролизатима третираних узорка се кретао у опсегу од 88% до 94%, што је око 3,5 пута више од приноса глукозе у хидролизату сирове биомасе (26% ± 2%). Ефикасна конверзија целулозе до глукозе је остварена уз употребу мале концентрације ензима. Наиме, у експерименталном раду је ензимска хидролиза након прелиминарне оптимизације извођена додавањем комерцијалне ензимске смеше *Cellic CTec2* у концентрацији која одговара 6 FPU по граму биомасе. Уобичајене колнцентрације ензима које се додају како би се добила одговарајућа концентрација шећера за потребе производње нпр. етанола крећу се у опсегу од 15 FPU до 20 FPU по граму биомасе [364]. Ефикасна конверзија целулозе до глукозе уз утрошак мале количине ензима је посебно важна при разматрању скалирања процеса до индустријских размера, јер би употреба мање количине ензима значајно редуковала трошкове.

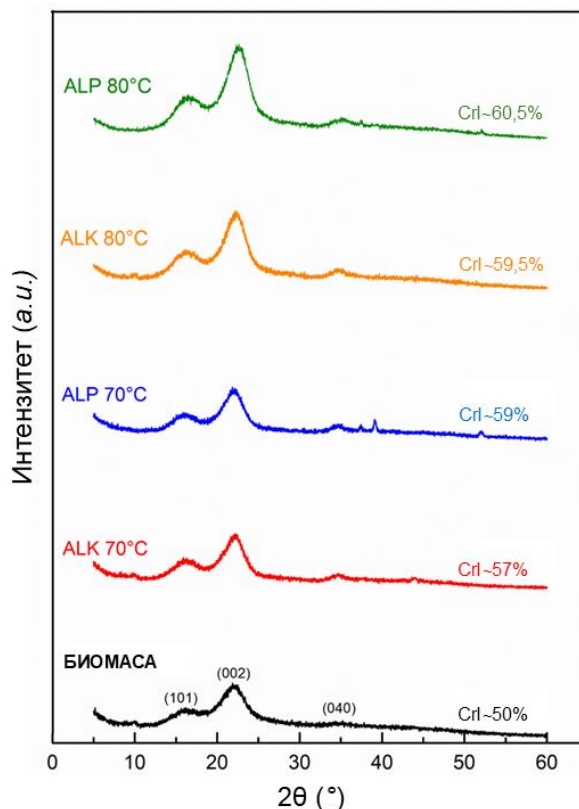
Након хемијске карактеризације и ензимске хидролизе третиране биомасе, испитане су и промене у морфологији, кристаличности и структури биомасе изазване током третмана. Морфолошке промене третиране биомасе су анализирани применом SEM. Добијене SEM микрографије сирове и третиране биомасе приказане су на слици 4.20.



Слика 4.20. SEM микрографија сирове биомасе (А, Г, Е), биомасе третиране алкалним третманом на 70 °С (Б, Д, Ж) и комбинованим плазма/алкалним третманом на 70 °С (Б, Б, З), при увећањима 1 000, 2 000, односно 10 000 пута

Површина сирове стабљике је груба и компактна, уз постојање додатних структура мање величине које вероватно потичу од лигнина. Ове структуре нису примећене на глаткој површини третираних узорка на којој се целулозна влакна много јасније уочавају. Осим оксидације бочних ланаца лигнина, кисеоник који настаје током алкалног третмана има способност да реагује са лигнином из ћелијског зида, што доводи до веће изложености целулозних влакана [365]. На површини сирове стабљике могу се уочити плитке поре малог пречника. Број и величина ових пора се значајно повећавају применом алкалног и комбинованог плазма/алкалног третмана, при чему је њихова величина након комбинованог плазма/алкалног третмана и до десет пута већа. Површинске промене узорка након третмана нетермалном плазмом уочене су и на третираној шећерној багаси [204]. Иако је плазма довела до повећања њене порозности, на SEM микрографији шећерне багасе третиране комбинованим аутохидролиза/плазма третманом уочена су оштећења целулозних влакана у виду дубоких

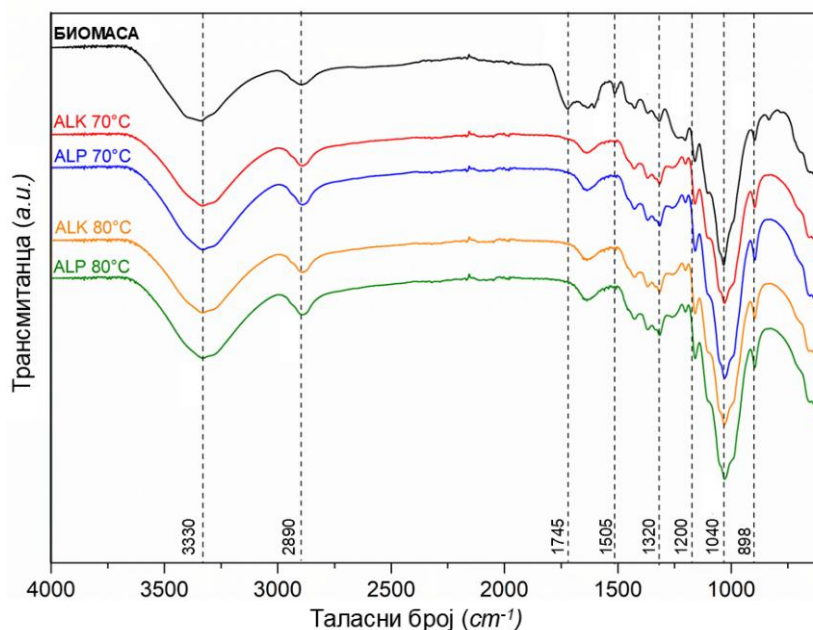
усека и нарушене структуре кроз неколико слојева влакна [204]. Комбинованим плазма/алкалним третманом кукурузне стабљике нису уочена драстична морфолошка оштећења. Поре настале на површини целулозног влакна имају униформнији распоред у односу на сирову стабљику или стабљику третирану само алкалним третманом. Ова униформност може бити и последица повећане кристаличности услед третмана, која би омогућила примену третиране стабљике као микрокристалне целулозе. Третирани узорци су подвргнути рендгенској дифракционој анализи. Добијени спектри и индекси кристаличности приказани су на слици 4.21.



Слика 4.21. XRD спектри и индекс кристаличности сирове биомасе, биомасе третиране алкалним третманом на 70 °C, односно 80 °C (*ALK 70 °C* и *ALK 80 °C*) и комбинованим плазма/алкалним третманом на 70 °C, односно 80 °C (*ALP 70 °C* и *ALP 80 °C*)

Реактивне врсте које настају током третмана нетермалном плазмом могу утицати на степен полимеризације целулозе, као и на њену уређеност. Карактеристични дифракциони пикови на око 16,2° и 22,5° потврђују да је третирана биомаса доминантно сачињена од целулозе I чија се кристална решетка не може пореметити у присуству алкалног водоник пероксида, али ни у присуству нетермалне плазме [315]. Међутим, индекс кристаличности третиране биомасе је већи у односу на сирову биомасу, са тенденцијом раста са повишењем температуре. Овај пораст индекса кристаличности је највероватније последица уклањања аморфних делова биомасе, тј. лигнина и хемицелулозе, а важно је да је показана неометана хидролиза третиране биомасе [358]. Највећи индекс кристаличности измерен у узорку третираном комбинованим плазма/алкалним третманом на 80 °C (*ALP 80 °C*) одговара највећем степену делигнификације, али и најнижем садржају хемицелулозе у том узорку. Индекс кристаличности од 60,5% измерен у овом узорку одговара индексу кристаличности микрокристалне целулозе добијене из коре диње [366], односно биљне биомасе (лат. *Washingtonia filifera*) [367]. Захваљујући повећаној порозности и кристаличности, целулозна фракција добијена комбинованим плазма/алкалним третманом на 80 °C би могла бити кандидат за примену у прехранбеној и фармацеутској индустрији, као и за развијање функционалних биоматеријала за потребе медицине, након даљих испитивања [368,369]. Повећање

кристалинчности третираних узорака одразило се и на укупни индекс кристалинчности прерачунао на основу FTIR спектра, који је порастао од почетних 0,93 у сировој биомаси до 0,96 у третираној биомаси. FTIR спектри сирове и третиране биомасе приказани су на слици 4.22.

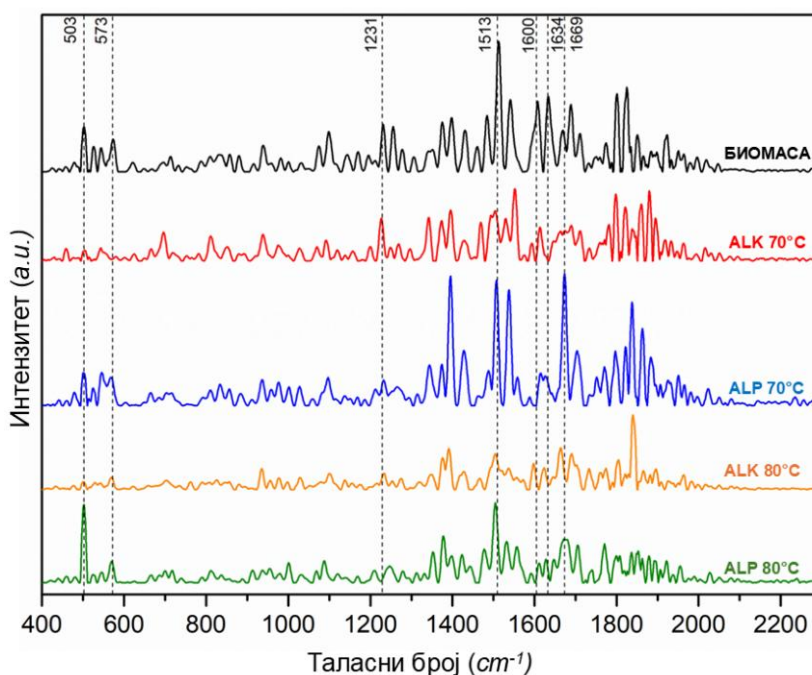


Слика 4.22. FTIR спектри сирове биомасе, биомасе третиране алкалним третманом на 70 °C, односно 80 °C (*ALK 70 °C* и *ALK 80 °C*) и биомасе третиране комбинованим плазма/алкалним третманом на 70 °C, односно 80 °C (*ALP 70 °C* и *ALP 80 °C*)

Примењени третмани су ослабили водоничне везе у узорцима ( $3\ 330\ \text{cm}^{-1}$ ), смањујући НВИ вредност са 1,01 у сировој биомаси до 0,96 у свим третираним узорцима. Осим тога, при наведеним условима је дошло и до кидања  $\beta$ -O-4 веза, доминантно присутних у лигнину, као и до уклањања ацетил група које улазе у састав хемицелулозе. Ове промене се на спектру уочавају као смањење интензитета пикова на око  $1\ 505\ \text{cm}^{-1}$  и  $1\ 745\ \text{cm}^{-1}$ , респективно [348,370]. Трагови лигнина и хемицелулозе који су и даље присутни у третираној биомаси уочавају се као пикови на око  $1\ 320\ \text{cm}^{-1}$ , односно на око  $1\ 040\ \text{cm}^{-1}$  [334,336]. Присуство резидуалног лигнина и хемицелулозе потврђено је и анализом хемијског састава третираних узорака применом NREL протокола (слика 4.18.). Такође, повећање интензитета пика на око  $898\ \text{cm}^{-1}$ , који је карактеристика  $\beta$ -гликозидне везе, сугерише да се третирана биомаса састоји доминантно из шећера [349], што је потврђено анализом хемијског састава. Осим целулозе, ове везе могу указивати и на присуство нецелулозних структурних полисахарида, што је такође утврђено применом Раман спектроскопије. Раман спектри сирове биомасе и третираних узорака приказани су на слици 4.23.

Присуство не-целулозних структурних полисахарида у третираној биомаси примећено је у узорцима третираним комбинованим плазма/алкалним третманом (*ALP 70 °C* и *ALP 80 °C*), као пикови на око  $503\ \text{cm}^{-1}$  и  $573\ \text{cm}^{-1}$  [337]. Делигнификација биомасе током примењених третмана потврђена је смањеним интензитетом пика на око  $1\ 231\ \text{cm}^{-1}$ , као и значајним смањењем интензитета пикова на око  $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$  и  $1\ 634\ \text{cm}^{-1}$ , карактеристичних за лигнин. Међутим, присуство пика на око  $1\ 513\ \text{cm}^{-1}$ , који потиче од истезања арил прстена, као и пика на око  $1\ 669\ \text{cm}^{-1}$ , који потиче од истезања веза у синапил и кониферил алкохолу, указују на присуство мањих количина резидуалног лигнина у третираној биомаси, што је претходно потврђено и FTIR спектроскопијом [338]. Интензитети ових пикова у третираној биомаси су највећи у случају комбинованог плазма/алкалног третмана на 70 °C, сугеришући да поменути третман има највећи утицај на деполимеризацију лигнина, што ће касније бити потврђено и анализом лигнинске фракције изоловане након тог третмана. Кондензација лигнина током

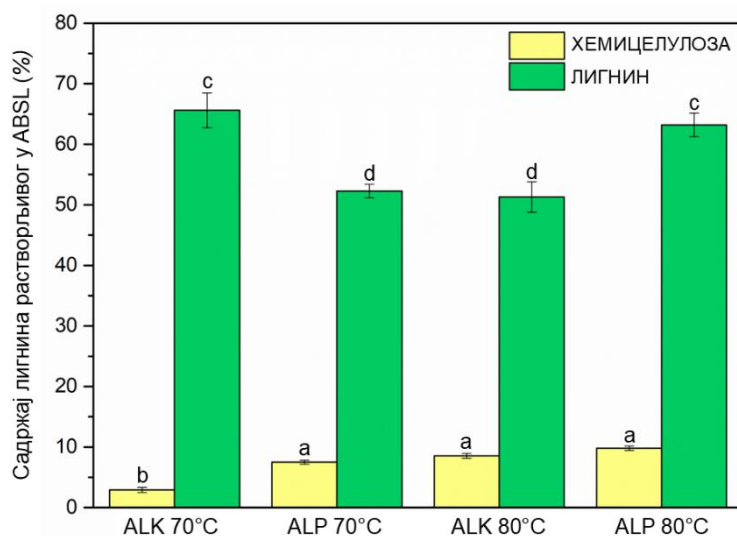
третмана може условити заустављање каталитичке разградње лигноцелулозе, чиме се смањује ефикасност примењеног третмана. Такође, кондензовани лигнин је теже изоловати, а његове лошије физичко-хемијске карактеристике ограничавају могућности даљег искоришћења [371], чиме се додатно истиче значај деполимеризације лигнина током третмана.



Слика 4.23. Раман спектри сирове биомасе, биомасе третиране алкалним третманом на 70 °C, односно 80 °C (*ALK 70 °C* и *ALK 80 °C*) и биомасе третиране комбинованим плазма/алкалним третманом на 70 °C, односно 80 °C (*ALP 70 °C* и *ALP 80 °C*)

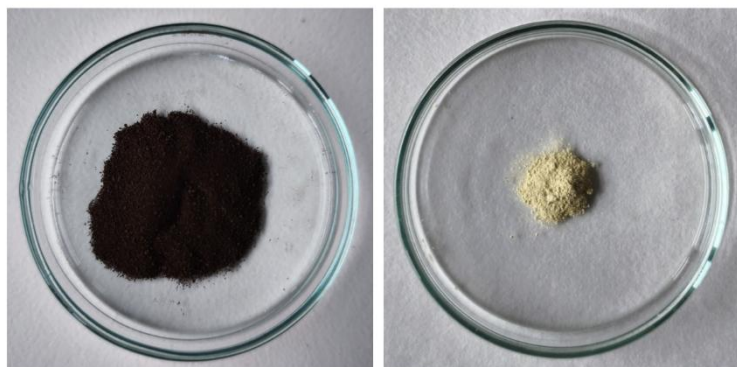
Након карактеризације третиране биомасе, испитана је могућност примене успостављеног третмана на различитим сировинама. Наиме, оптимизација алкалног и комбинованог плазма/алкалног третмана је вршена на кукурузној стабљивици означеној као *узорак 1* (табела 4.1.). Затим је комбиновани плазма/алкални третман на 70 °C (*ALP 70 °C*) извршен при истим условима и на стабљивици означеној као *узорак 2*. Након третмана првог узорка, остварени степен делигнификације је износио  $75,6\% \pm 0,7\%$ , док је у случају другог узорка уклоњено  $78,9\% \pm 1,8\%$  лигнина. Тиме је потврђено да је развијени третман подједнако ефикасан на сировинама променљивог хемијског састава, што је један од главних услова за укључивање третмана у биорафинеријске поступке [22].

Након издвајања третиране биомасе, из течне фракције заостале након третмана изоловане су лигнинска и хемицелулозна фракција, према протоколу описаном у одељку 3.5.2. Обе фракције су анализирана применом методе са ацетил бромидом како би се проценио степен пречишћености лигнинске фракције, односно утврдио садржај резидуалног лигнина у хемицелулозној фракцији. Добијени резултати приказани су на слици 4.24.



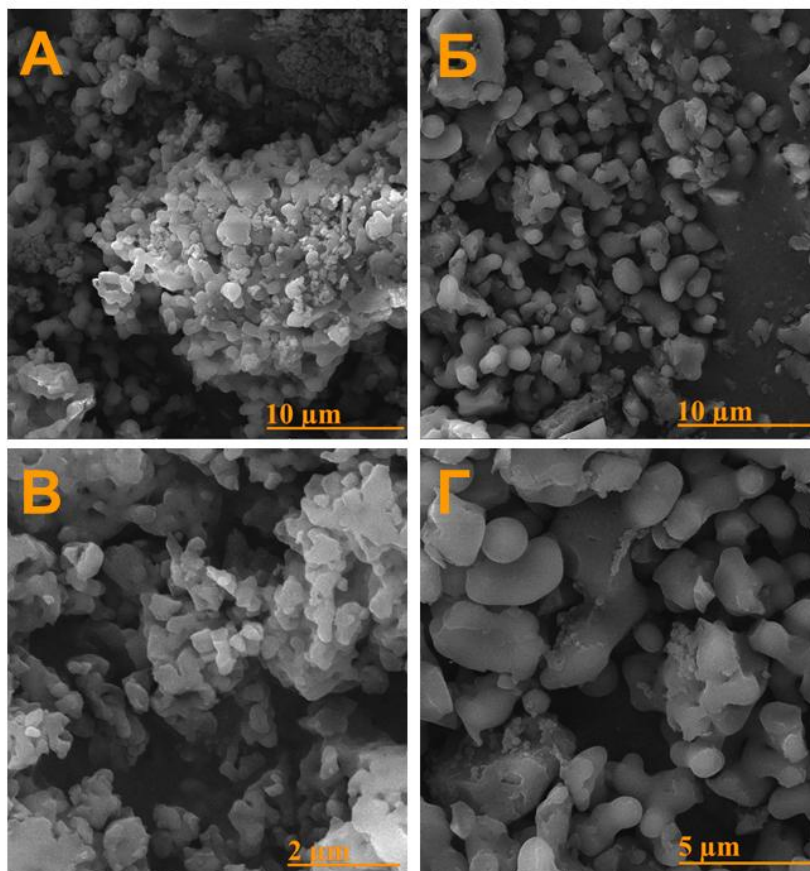
Слика 4.24. Садржај лигнина у хемицелулозној и лигнинској фракцији изолованим након алкалног третмана на 70 °C, односно 80 °C (ALK 70 °C и ALK 80 °C) и након комбинованог плазма/алкалног третмана на 70 °C, односно 80 °C (ALP 70 °C и ALP 80 °C)

Садржај лигнина у свим изолованим лигнинским фракцијама прелазео је 50%, док је у свим хемицелулозним фракцијама био нижи од 10%. Тиме је потврђено да су примењени третмани погодни за фракционисање лигноцелулозне биомасе и добијање раздвојених фракција високог степена пречишћености уз веома једноставну процедуру. Применом предложене процедуре могуће је изоловати 33-43% хемицелулозе иницијално присутне у сировој биомаси. Како је од 54 до 64% хемицелулозе и даље остало везано за целулозу након третмана (слика 4.19.), хемицелулозна фракција је изолована уз минималне губитке. Упркос високом степену делигнификације, из течне фракције заостале након третмана је изоловано мање од 10% лигнина иницијално присутног у биомаси. Највећи део лигнина уклоњеног третманом је највероватније остао „заробљен“ у течној фракцији заосталој након третмана, те би даље требало унапредити поступак изоловања фракција у циљу остваривања виших приноса лигнина. Примењена ABSL анализа је показала да је алкални третман на 70°C дао највиши садржај лигнина у лигнинској фракцији и најнижи садржај лигнина у хемицелулозној фракцији. Ипак, потребно је детаљније анализирати све добијене фракције како би се утврдио најпогоднији третман за даљи развој биорафинеријског поступака. За разлику од лигнинске фракције изоловане након комбинованог плазма/Фентон третмана (слика 4.16), фракције лигнина изоловане након алкалног и комбинованог плазма/алкалног третмана карактерише, светло браон боја, што их чини погоднијим за примену и представља погоднији органолептички профил. Изглед изоловане лигнинске фракције у односу на комерцијални крафт лигнин приказан је на слици 4.25.



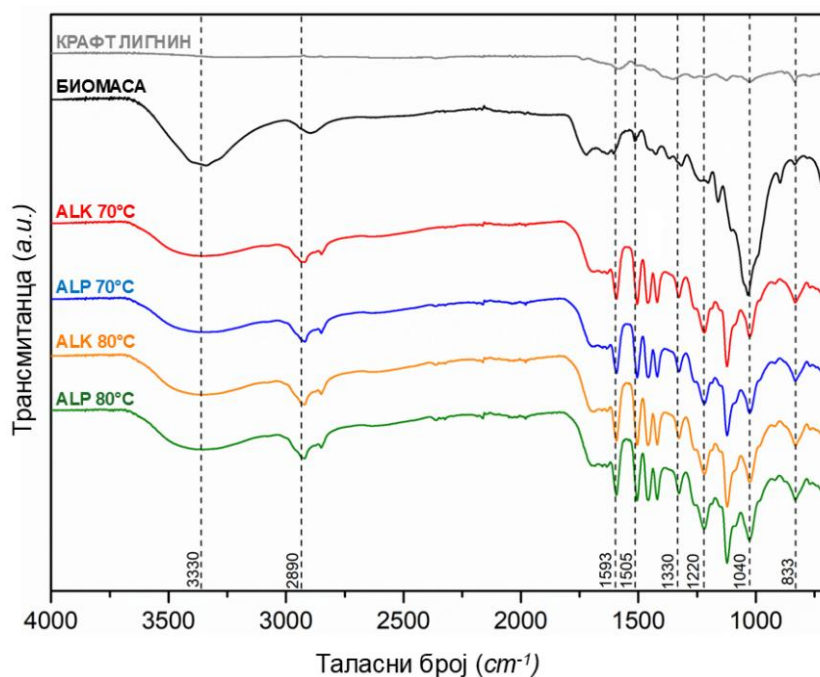
Слика 4.25. Изглед комерцијалног крафт лигнина (лево) и лигнинске фракције изоловане након комбинованог плазма/алкалног третмана на 70 °C (десно)

Морфологија изолованих лигнинских фракција анализирана је применом SEM-а. Добијени микрографи приказани су на слици 4.26.



Слика 4.26. SEM микрографија лигнинске фракције изоловане након алкалног третмана на 70 °C (A, B) и након комбинованог плазма/алкалног третмана на 70 °C (B, Г), при увећањима 5 000, 10 000, односно 20 000 пута

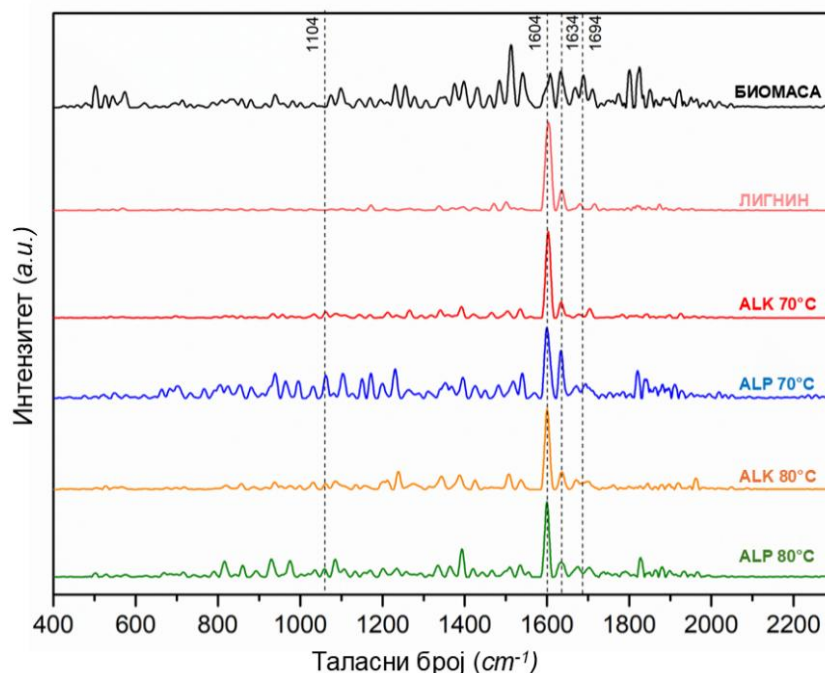
Као резултат примене алкалног и комбинованог плазма/алкалног третмана изоловане су микро- и наночестице лигнина. Након алкалног третмана добијене су честице неправилне величине и облика, које су организоване у агломерате. Међутим, применом плазме, ове честице попримају сферичан облик, униформнију величину и виде се као засебне честице које нису слепљене. Агломерација је уобичајена појава приликом синтезе наночестица лигнина у киселим и базним условима. Овај проблем се превазилази додавањем агенаса за умрежавање, попут глутаралдехида, или применом брзе, тзв. „флеш“ преципитације (енгл. *flash precipitation*), нанопречипитације или надкритичних флуида, попут угљеник (IV) оксида [372]. Применом нетермалне плазме се може спречити агломерација честица лигнина, при чему се облик и величина ових честица може контролисати подешавањем процесних параметара. Осим тога, плазма доводи и до оксидације лигнина, чинећи га погоднијим за примену као ароматичног прекурсора у производњи вештачких арома, фармацеутских производа и реагенаса добијених биорафинеријским поступцима [353]. Такође, оксидовани лигнин се може користити и за производњу материјала на бази угљеника који се користе за складиштење енергије [373]. Оксидација лигнина потврђена је FTIR анализом. FTIR спектри изолованих лигнинских фракција приказани су на слици 4.27.



Слика 4.27. FTIR спектри комерцијалног крафт лигнина, сирове биомасе и лигнинске фракције изоловане након алкалног третмана на 70 °C, односно 80 °C (*ALK 70 °C* и *ALK 80 °C*) и комбинованог плазма/алкалног третмана на 70 °C, односно 80 °C (*ALP 70 °C* и *ALP 80 °C*)

Спектри свих изолованих фракција изгледају слично. У свим фракцијама примећено је присуство пикова на око 3 330  $\text{cm}^{-1}$ , 2 890  $\text{cm}^{-1}$ , 1 745  $\text{cm}^{-1}$  и 1 040  $\text{cm}^{-1}$ , који потичу од целулозе и хемицелулозе које су остале везане за лигнин. Како је интензитет ових пикова у изолованим фракцијама значајно мањи у односу на сирову биомасу, лигнинске фракције садрже мале количине угљено-хидратне компоненте. Међутим, изоловане фракције карактерише и повећани број и интензитет пикова на делу спектра од 1 600  $\text{cm}^{-1}$  до 1 700  $\text{cm}^{-1}$  и од 1 000  $\text{cm}^{-1}$  до 1 300  $\text{cm}^{-1}$ , који потичу од C=O веза у карбонилним групама и C-O веза у фенолима, алкохолима, етарским и естарским групама, респективно. Присуство ових пикова, као и повећање њихових интензитета, последица су стварања нових кисеоничних функционалних група изазваног нетермалном плазмом, односно оксидације лигнина [374]. Изоловани лигнин је током третмана трансформисан у једињења мање молекулске масе и јединствених хемијских својстава. Ово потврђују и интензивнији пикови на око 1 220  $\text{cm}^{-1}$ , 1 123  $\text{cm}^{-1}$  и 833  $\text{cm}^{-1}$ , који потичу од синргил јединице лигнина [359]. Деполимеризација лигнина је уочена и применом Раман спектроскопије. Раман спектри изолованих лигнинских фракција приказани су на слици 4.28.

На Раман спектру сирове лигнинске фракције уочавају се два карактеристична пика на 1 604  $\text{cm}^{-1}$  и 1 634  $\text{cm}^{-1}$ . Ови пикови потичу од ароматичних структура присутних у лигнину и веза присутних у кониферилалдехиду, синапилалдехиду и естрима фенола, респективно [351]. Ови пикови су уочени и у свим изолованим фракцијама. Значајно већи интензитет пика на око 1 634  $\text{cm}^{-1}$  у узорку *ALP 70 °C* потврђује да је овај третман изазвао највеће промене у структури лигнина. Осим тога, велики број нових пикова на делу спектра од 900  $\text{cm}^{-1}$  до 1 300  $\text{cm}^{-1}$  потврђује да је у узорцима третираним нетермалном плазмом дошло до значајније деполимеризације и оксидације лигнина [351,375]. Ово је потврдила и PCA (енгл. *Principal Component Analysis*) спектра добијених Раман спектроскопијом [376]. Такође, потврђено је и присуство малих количина целулозе и хемицелулозе, као и применом FTIR спектроскопије. Карактеристични пикови за угљене хидрате уочавају се на око 1 104  $\text{cm}^{-1}$  и 1 694  $\text{cm}^{-1}$  [377].



Слика 4.28. Раман спектри сирове биомасе, сирове лигнинске фракције изоловане из стабљике (*лигнин*) и лигнинске фракције изоловане након алкалног третмана на 70 °C, односно 80 °C (*ALK 70 °C* и *ALK 80 °C*) и након комбинованог плазма/алкалног третмана на 70 °C, односно 80 °C (*ALP 70 °C* и *ALP 80 °C*)

Како би се утврдило како деполимеризација и оксидација лигнина утичу на његову биолошку активност, одређени су концентрација укупних полифенола и антиоксидативна активност екстракта изолованих фракција. Анализирани су екстракти лигнинских фракција у диметил-сулфоксиду, концентрације 2 g L<sup>-1</sup>. Добијени резултати приказани су у табели 4.4.

Табела 4.4. Биолошка активност изолованих лигнинских фракција

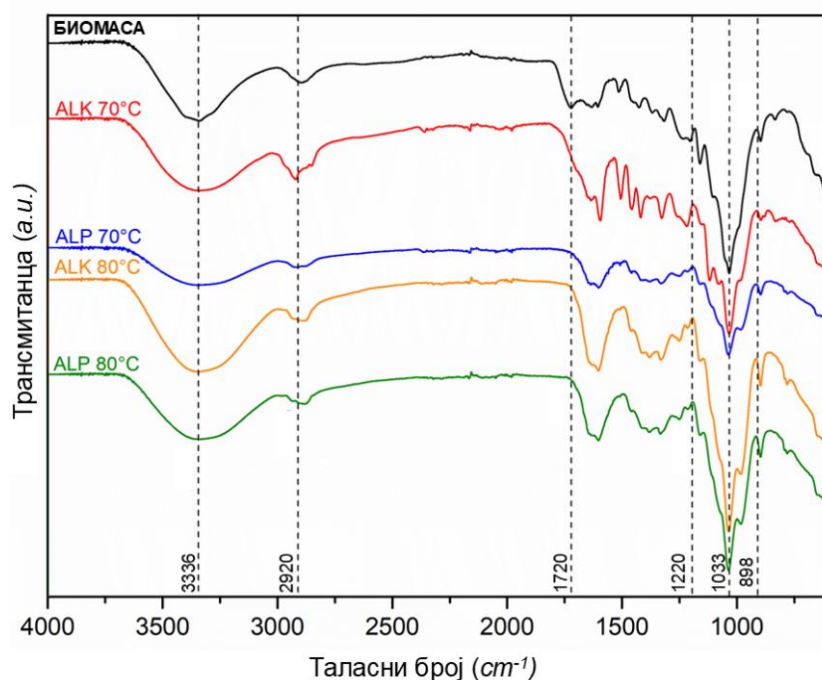
Узорак	GAE ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	ABTS инхибиција (%)	ABTS TE ( $\text{mM mg}^{-1}$ )	DPPH инхибиција (%)	DPPH TE ( $\text{mM mg}^{-1}$ )
<i>Крафт лигнин</i>	181±18	25±1	1,1±0,0	53 ± 4	0,9±0,1
<i>ALK 70 °C</i>	107±12	20±2	0,9±0,1	26 ± 3	0,4±0,1
<i>ALP 70 °C</i>	140±20	20±1	0,9±0,0	26 ± 1	0,4±0,0
<i>ALK 80 °C</i>	121±19	21±2	0,9±0,1	27 ± 2	0,5±0,1
<i>ALP 80 °C</i>	120±7	19±1	0,8±0,0	25 ± 1	0,4±0,0

*ALK* – алкални третман, *ALP* – комбиновани плазма/алкални третман, *GAE* – еквивалент галне киселине, *TE* – еквивалент Тролокса

Екстракти изолованих лигнинских фракција су били богати полифенолима. Концентрације укупних полифенола у екстрактима лигнина изолованих из различитих лигноцелулозних сировина се крећу од 9 mg GAE g<sup>-1</sup> до чак 303 mg GAE g<sup>-1</sup>, у зависности од методе изоловања и степена пречишћености [378–380], при чему су вредности веће од 200 mg GAE g<sup>-1</sup> карактеристичне за лигнине изоловане из лишћа различитог порекла. Ниже концентрације укупних полифенола су добијене у изолованим фракцијама добијеним у поступцима са плазмом у односу на крафт лигнин. Садржај лигнина у изолованим фракцијама се кретао у опсегу од 52% до 66% (слика 4.24.), док је у случају комерцијалног крафт лигнина износио 94,7% ± 4,4%. Ово указује на потребу за унапређење поступка за изоловање и пречишћавање лигнина, али и на могућност добијања фракција богатијих полифенолима. Испитана је и могућност екстраховања више полифенола променом растварача. У ову сврху припремљени су екстракти изолованих лигнинских фракција у метанолу, при истој концентрацији као у случају диметил-сулфоксида. Међутим, метанол се показао као непогодан растварач, уз просечну концентрацију укупних полифенола од 64,2 mg GAE g<sup>-1</sup> ± 1,0 mg GAE

$\text{g}^{-1}$  у метанолним екстрактима [376]. Екстракти лигнина у диметил-сулфоксиду су показали и значајну антиоксидантну активност, у опсезима концентрација пријављиваним и у претходним студијама [378,381]. Међу биолошким својствима лигнина анализирана је и антимикуробна активност. Испитан је утицај екстраката изолованих лигнинских фракција на четири одабрана представника патогених микроорганизама – *B. cereus*, *C. albicans*, *E. coli* и *S. aureus*, али није показана значајна антимикуробна активност. Пошто су лигнинске фракције екстраховане у диметил-сулфоксиду, који при високим концентрацијама и сам инхибира раст микроорганизама, неопходно је екстракте разблажити до концентрације диметил-сулфоксида од 2% [308]. Разблаживање екстраката је свакако довело и до смањења концентрације полифенолних једињења присутних у екстрактима. За добијање екстраката лигнинских фракција са јачом антимикуробном активношћу, потребно је прилагодити услове третмана добијању чистијих фракција лигнина, а потом и извршити оптимизацију екстракције са овим циљем. Додатно, у наредним фазама истраживања би требало испитати и примену самих наночестица лигнина у ихибитији раста патогених микроорганизама. Постигнута оксидација лигнина, добијене фракције нано и микролигнина погодних органолептичких својстава и одређена антиоксидантна активност указују да развијени поступак са плазмом отвара нове могућности за искоришћење лигнинске фракције упоредо са искоришћењем угљених хидрата. Ово представља веома важан допринос и основ за даља испитивања и оптимизације поступака добијања чистијих лигнинских фракција дефинисаних карактеристика.

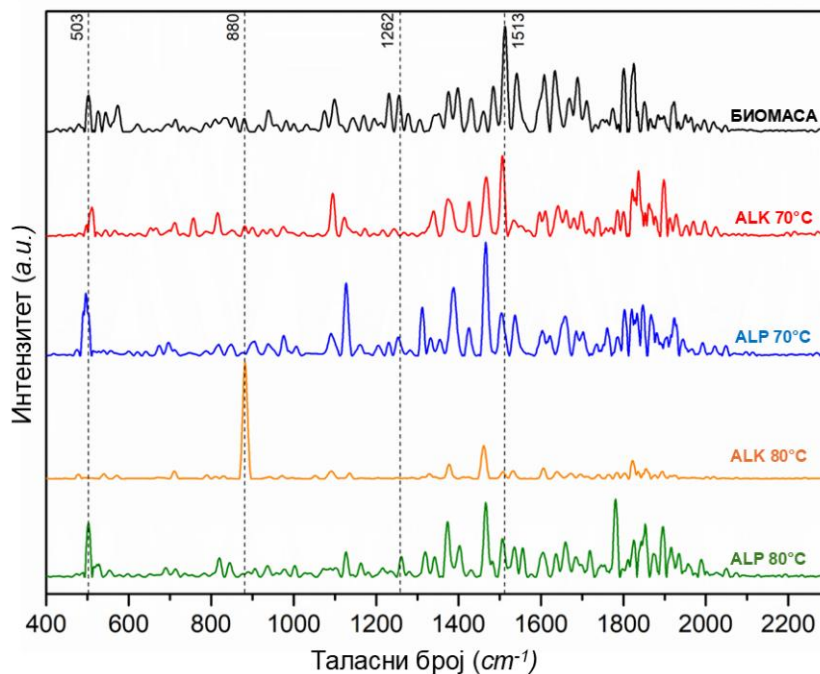
Након карактерисања целулозне и лигнинске фракције, изоловане хемицелулозне фракције су окарактерисане применом FTIR и Раман спектроскопије. FTIR спектри изолованих хемицелулозних фракција приказани су на слици 4.29.



Слика 4.29. FTIR спектри сирове биомасе и хемицелулозне фракције изоловане након алкалног третмана на 70 °C, односно 80 °C (*ALK 70 °C* и *ALK 80 °C*) и након комбинованог плазма/алкалног третмана на 70 °C, односно 80 °C (*ALP 70 °C* и *ALP 80 °C*)

Примењени третмани су изазвали веће промене у структури хемицелулозе на 70 °C у односу на 80 °C. Одсуство пика на око 1 720  $\text{cm}^{-1}$ , указује на то да је током примењених третмана дошло до потпуне сапонификације ацетил, уронских и естарских функционалних група, типичних за хемицелулозу [382]. Сапонификација је довела до разградње хемицелулозе током третмана, што потврђује и хемијски састав третираних узорака (слика 4.18.). Изражен пик на око 1 040  $\text{cm}^{-1}$  потврђује да је хемицелулоза изграђена доминантно из ксилана [333]. Моно- и олигосахариди који улазе у састав хемицелулозе су међусобно повезани  $\beta$ -1,4-

гликозидним везама, што се на спектру уочава као пик на око  $898\text{ cm}^{-1}$  [349]. Пик на око  $1\,330\text{ cm}^{-1}$  потиче од сиригил јединице лигнина [335] и потврђује да је мала количина лигнина остала везана за хемицелулозу, што је претходно утврђено и на основу садржаја резидуалног лигнина у изолованим фракцијама (слика 4.24.). Сличне промене у структури уочене су и применом Раман спектроскопије. Раман спектри изолованих хемицелулозних фракција приказани су на слици 4.30.



Слика 4.30. Раман спектри сирове биомасе и хемицелулозне фракције изоловане након алкалног третмана на  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , односно  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*ALK 70 °C* и *ALK 80 °C*) и након комбинованог плазма/алкалног третмана на  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , односно  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*ALP 70 °C* и *ALP 80 °C*)

Разлике у изгледу Раман спектра изолованих фракција последица су хетерогеног и променљивог састава хемицелулозе, чиме се отежава њена валоризација. Добијени спектри указују на то да су нешто сличније промене у структури изазване применом комбинованог плазма/алкалног третмана (*ALP 70 °C* и *ALP 80 °C*), за разлику од FTIR спектра, на којима су већу сличност показали узорци третирани на  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*ALK 80 °C* и *ALP 80 °C*). Такође, структурне промене су интензивније у узорцима третираним комбинованим плазма/алкалним третманом. Присуство не-целулозних структурних полисахарида уочено је у свим фракцијама, осим у *ALK 80 °C*, као пик на око  $503\text{ cm}^{-1}$ . Са друге стране, само у *ALK 80 °C* је примећен пик на око  $880\text{ cm}^{-1}$ , који води порекло од целобиозе [351]. Пик на око  $1\,513\text{ cm}^{-1}$ , који потиче од истежања арил прстена лигнина потврђује присуство мањих количина резидуалног лигнина у изолованим фракцијама [338], што је претходно утврђено применом методе са ацетил бромидом (слика 4.24.). Смањење интензитета пика на око  $1\,262\text{ cm}^{-1}$ , карактеристичног за целулозу, у односу на сирову биомасу, сугерише да је хемицелулоза скоро потпуно одвојена од целулозе током третмана [383].

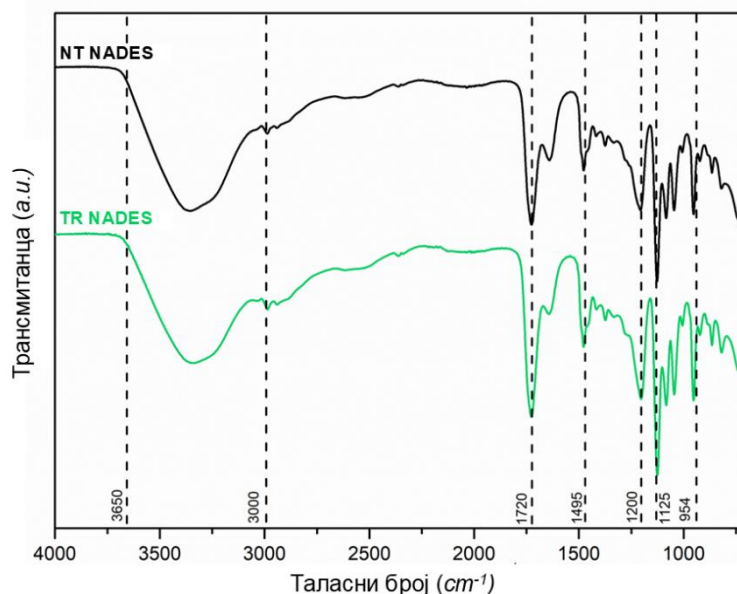
Добијене хемицелулозне фракције се могу користити у производњи биофилмова и хидрогелова који служе као носачи у фармацеутским формулацијама. Осим тога, захваљујући хидрофилном карактеру који потиче од ксилана, биофилмови на бази хемицелулозе могу бити коришћени у биоразградивим паковањима хране уз способност стварања баријере између самог паковања и липида присутних у храни [384]. Међутим, неопходно је оптимизовати развијене третмане у добијању што чистије хемицелулозе, високог квалитета и униформне структуре, како би њена валоризација била потпуна. Значајно уклањање хемицелулозе и њена ефикасна рекулперација, уз максимално искоришћење целулозне и лигнинске фракције може се постићи и третманом биомасе дубоким еутектичким смешама [385]. Стога је испитана

могућност повећања ефикасности третмана кукурузне стабљике природним дубоким еутектичким смешама у комбинацији са нетермалном плазмом.

#### 4.6. Комбиновани нетермална плазма/природне дубоке еутектичке смеше третман

Природне дубоке еутектичке смеше (NADES) представљају биокомпатибилне и биоразградиве органске раствараче, што их чини погодним за примену у биорафинеријским поступцима. Могућност њихове рекулерације и поновне употребе је у складу са принципима одрживог развоја. Међутим, физичко-хемијске карактеристике ових смеша, а пре свега велика вискозност, ограничавају њихову примену у третману лигноцелулозне биомасе. Смањење вискозности ових смеша може се постићи загревањем или додатком воде, док извор топлотне енергије утиче на енергетску ефикасност процеса. Третман природним дубоким еутектичким смешама потпомогнут нетермалном плазмом је нов концепт развијен у оквиру ове дисертације како би се испитали ефекти на фракционисање лигноцелулозних супстрата.

Оптимизацији комбинованог нетермална плазма/природне дубоке еутектичке смеше третмана претходило је испитивање могућности примене плазме на саму еутектичку смешу. Како би се утврдио утицај третмана плазме на структуру еутектичке смеше, смеша холин хлорида и млечне киселине у молском односу 1:2, уз додаток 10% (мас.) воде је третирана плазмом током 30 min. У овој фази истраживања одабрана је еутектичка смеша која је садржала најмањи проценат воде и главне компоненте у најближем односу погодном за формирање смеше, уз претпоставку да ће се промене најпре уочити при таквом саставу. Непосредно након третмана извршена је анализа применом FTIR спектроскопије, уз нетретирану еутектичку смешу као контролни узорак. Добијени спектри су приказани на слици 4.31.



Слика 4.31. FTIR спектри нетретиране природне дубоке еутектичке смеше (NT NADES) и природне дубоке еутектичке смеше третиране плазма иглом током 30 min (TR NADES)

На основу FTIR спектра који изгледају готово идентично пре и након третмана плазма иглом, потврђено је да плазма нема негативан утицај на саму еутектичку смешу. Карактеристичан пик на око  $1720\text{ cm}^{-1}$  одговара карбонилној функционалној групи присутној у молекулу млечне киселине [386]. Истежање C-O-C везе се на спектру уочава у виду пика на око  $1495\text{ cm}^{-1}$ , а истежање C=O везе као пик на око  $1580\text{ cm}^{-1}$  [387]. Широки пик који се простире између  $3000\text{ cm}^{-1}$  и  $3650\text{ cm}^{-1}$  потиче од водоничних веза које улазе у састав и млечне киселине и холин хлорида. Благо проширење и смањење интензитета овог пика након третмана плазмом резултат је стварања нових водоничних веза приликом излагања еутектичке смеше плазми. Сличан феномен уочен је услед формирања водоничних веза у еутектичким смешама сачињеним од холин хлорида и етилен гликола, односно холин хлорида и орцинола [388]. Како

се образовање еутектичких смеша заснива на стварању водоничних веза између компонената које улазе у састав смеше, излагање еутектичке смеше плазми би могло да доведе до повећања њене стабилности. Пикови на делу спектра од  $900\text{ cm}^{-1}$  до  $980\text{ cm}^{-1}$  односе се на кватернарна амонијумова једињења, док пикови на око  $1\ 125\text{ cm}^{-1}$  и  $954\text{ cm}^{-1}$  потичу од C-N групе присутне у молекулу холин хлорида [389]. Након што је потврђено да плазма не нарушава структуру дубоких еутектичких смеша уследила је оптимизација комбинованог плазма/NADES третмана.

Оптимизација комбинованог плазма/NADES третмана вршена је применом Тагучијевог ортогоналног дизајна експеримената. Вариране су вредности три кључна фактора – однос холин хлорида и млечне киселине у еутектичкој смеси, садржај воде која се додаје смеси и дужина трајања третмана плазмом (табела 3.1.). Циљ оптимизације је било постизање највишег степена делигнификације, те је за прорачун S/N односа одабран „*веће је боље*“ критеријум. Процесни одговори за S/N однос при поменутом критеријуму приказани су у табели 4.5.

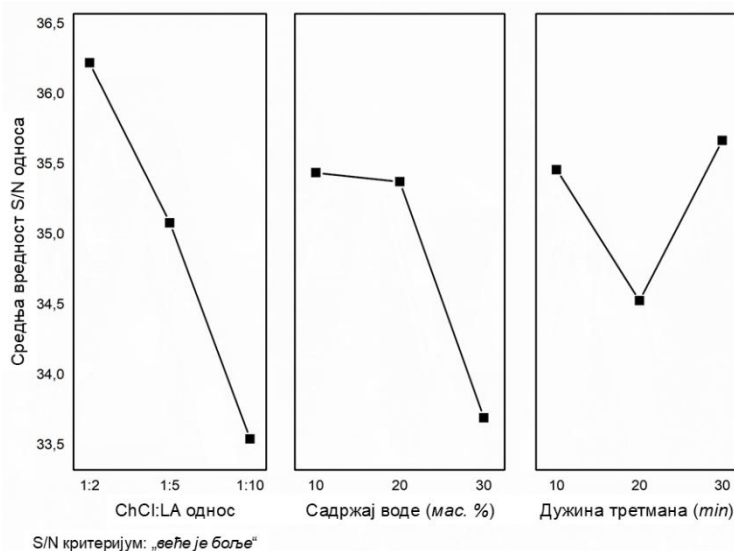
Табела 4.5. Процесни одговори за S/N\* однос

Ниво	ChCl:LA** однос	Садржај воде (мас. %)	Дужина третмана (min)
1	36,15	35,53	35,21
2	35,01	35,46	33,92
3	33,47	33,65	35,50
Делта	2,68	1,88	1,57
Ранг	1	2	3

\*S/N критеријум: „*веће је боље*“

\*\*ChCl:LA – молски однос холин хлорида и млечне киселине у еутектичкој смеси

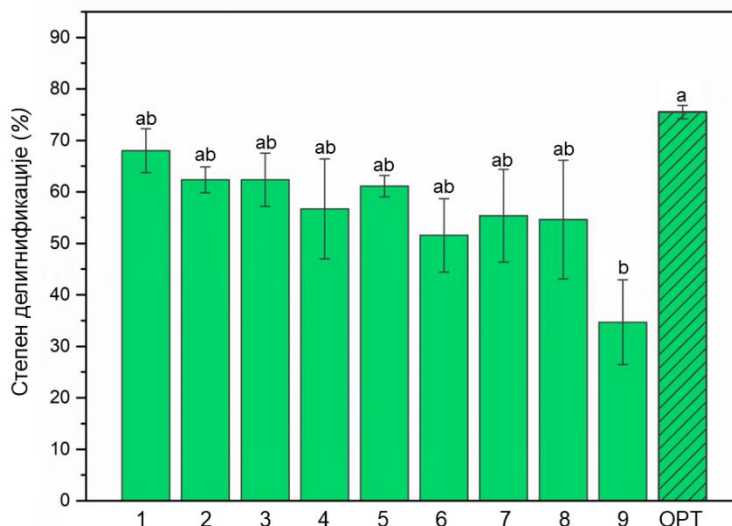
Вредности означене као „делта“ представљају разлику највећег и најмањег S/N односа за сваки фактор. Веће вредности указују на већи утицај одговарајућег фактора на процесни одговор. Највећи утицај на ефикасност делигнификације има састав еутектичке смеше, тј. молски однос холин хлорида и млечне киселине, док је дужина третмана нетермалном плазмом најмање утицала на степен делигнификације. Утицај одабраних фактора на ефикасност третмана приказан је на слици 4.32.



Слика 4.32. Утицај састава NADES, садржаја додате воде и дужине трајања третмана на делигнификацију биомасе

Оптималне вредности сва три фактора при којима се постиже највећа делигнификација одговарају највећој вредности S/N односа. Оптимални услови за извођење комбинованог плазма/NADES третмана су: молски однос холин хлорида и млечне киселине 1:2 (*ниво 1*), уз додавање 10% (мас.) воде (*ниво 1*) и третирање смеше NADES/биомаса плазмом током 30 min (*ниво 3*). Наведена комбинација процесних параметара се не налази ни у једном од девет

претходно изведених експеримената, те је изведен и валидациони експеримент. Валидационим експериментом је потврђено постизање највишег степена делигнификације третиране биомасе од  $75,5\% \pm 1,3\%$ . Степен делигнификације биомасе третиране комбинованим плазма/NADES третманом при процесним условима дефинисаним у табели 3.1. и при оптималним условима приказани су на слици 4.33.



Слика 4.33. Степен делигнификације биомасе третиране комбинованим плазма игла/NADES третманом при различитим процесним условима (1-9, табела 3.1.) и при оптималним условима (OPT). Шрафирани узорак је одабран као најпогоднији за даљу карактеризацију.

Анализа варијансе је примењена као статистички алат како би се додатно проценио утицај и значај сваког од кључних фактора на ефикасност третмана. Добијене вредности ANOVA параметара су приказане у табели 4.6. Иако нису уочене статистички значајне разлике међу факторима ( $P > 0,05$  за сва три фактора), потврђено је да највећи утицај на ефикасност третмана има молски однос холин хлорида и млечне киселине у еутектичкој смеси, са доприносом од чак  $50,8\%$ , док најмањи утицај има дужина трајања третмана, што је усаглашено са вредностима наведеним у табели 4.5.

Табела 4.6. Анализа варијансе S/N односа

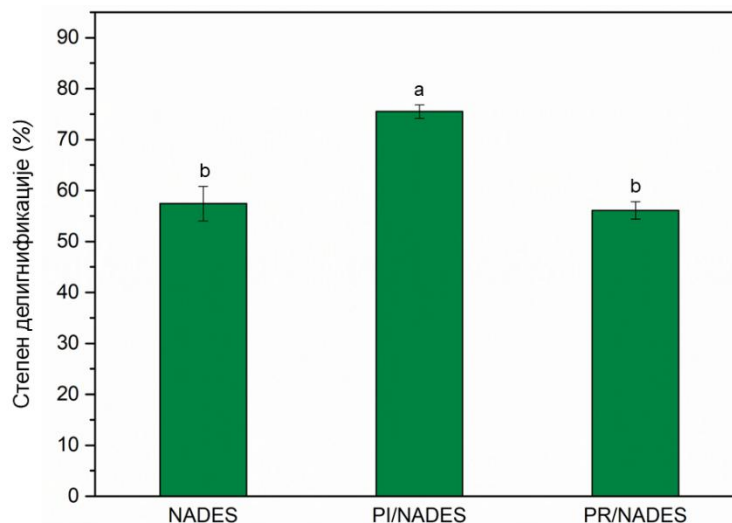
	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	SS'	F	P	C (%)
ChCl:LA однос	2	384,9	384,9	192,5	369,0	3,38	0,104	50,8
Садржај воде (мас.%)	2	206,7	206,7	103,3	190,8	1,19	0,366	26,2
Дужина третмана (min)	2	119,1	119,1	59,6	103,2	0,59	0,584	14,2
Резидуална грешка	2	15,9	15,9	8,0	63,9			8,8
Укупно	8	726,6						100

DF – степени слободe; Seq SS – секвенцијална сума квадрата; Adj SS – прилагођена сума квадрата; Adj MS – прилагођена средња вредност квадрата; SS' – чиста сума квадрата; F – Фишера вредност; P – вредност вероватноће; C – допринос

Како су „делта“ вредност и вредност доприноса за дужину трајања третмана плазмом биле најниже, а процесни одговори S/N односа били блиски при све три дужине трајања третмана, испитана је и могућност примене плазме у краћим временским интервалима, у циљу повећања укупне енергетске ефикасности третмана. Иако је нешто мање лигнина уклоњено након 10 min ( $72,5\% \pm 0,9\%$ ) и након 20 min ( $71,5\% \pm 4,3\%$ ) у односу на 30-минутни третман ( $75,5\% \pm 1,3\%$ ), разлике у вредностима оствареног степена делигнификације нису статистички значајне. Стога је могуће постићи високу ефикасност третмана и за само 10 min, чиме се смањују потребе за потрошњом енергије. Механизам делигнификације биомасе применом смеше на бази холин хлорида и млечне киселине заснива се на стварању високо реактивних бензил радикала у бочном ланцу лигнина. Истовремено долази и до оксидације, чиме се

поспешује деполимеризација лигнина [95,97]. Исте промене у структури лигнина се могу уочити и применом плазме [194], те је синергистичким деловањем плазме и еутектичке смеше могуће постићи ефикасну делигнификацију и при краћим дужинама третмана. Синергистичко дејство еутектичке смеше могу испољити и са третманом микроталасима или применом ултразвука. Feng и сар. (2024) су потврдили да се десетоминутним третманом мосо бамбуса у микроталасном реактору на 120 °C може уклонити од 65% до 80% лигнина, применом меша сачињеним од глицерола и гуанидин-хидрохлорида у молском односу 2:1, уз додатак различитих Луисових киселина као треће компоненте смеше [390]. Третман шећерне багасе применом смеше сачињене од холин хлорида и млечне киселине у микроталасном реактору на 135°C довео је до уклањања 84% лигнина за свега 20 min [101]. Док се третмани у микроталасним реакторима изводе у кратким временским интервалима и на повишеној температури, примена ултразвука захтева продужавање третмана. Ма и сар. (2022) су третирали кукурузни окласак најпре ултразвуком на собној температури, а затим и конвенционалним загревањем у уљаном купатилу [93]. При оптималним условима, који су подразумевали 60-минутни третман ултразвуком, праћен загревањем на 120 °C током 3 h, из окласка је уклоњено 87,5% лигнина [93]. Веома важна предност третмана развијеног у оквиру ове дисертације је да се десетоминутним третманом плазмом постиже изузетно висока вредност делигнифиције, упоредива са третманима који захтевају загревање на температурама преко 70 °C често и током неколико часова.

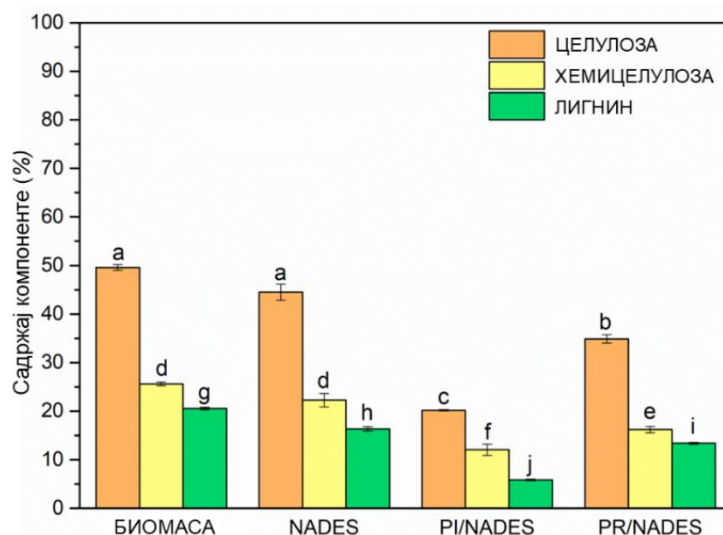
Након утврђивања оптималних услова за третман плазма иглом (*PI/NADES*), исти услови су коришћени за третман биомасе у нетермалном плазма реактору са диелектричним баријерним пражњењем (*PR/NADES*), како би се испитала могућност скалирања процеса. Осим тога, као контролни узорак је припремљена биомаса која је третирана само еутектичком мешом (*NADES*), без плазме, да би се утврдио допринос плазме ефикасности делигнификације. У овим узорцима је најпре одређен садржај резидуалног лигнина и одговарајући степен делигнификације, након чега је уследила комплетна карактеризација структурних и морфолошких карактеристика, као и испитивање могућности валоризације добијених фракција. Остварени степен делигнификације приказан је на слици 4.34.



Слика 4.34. Степен делигнификације биомасе третиране еутектичком мешом (*NADES*) и комбинованим плазма игла/*NADES* третманом (*PI/NADES*) и плазма реактор/*NADES* третманом (*PR/NADES*)

Више од половине количине лигнина присутног у сировој биомаси може се уклонити применом третмана еутектичком мешом или применом комбинованог плазма реактор/*NADES* третмана. Ипак, значајно већа количина лигнина је уклоњена применом комбинованог плазма игла/*NADES* третмана, који је и извођен при оптималним условима. За постизање веће

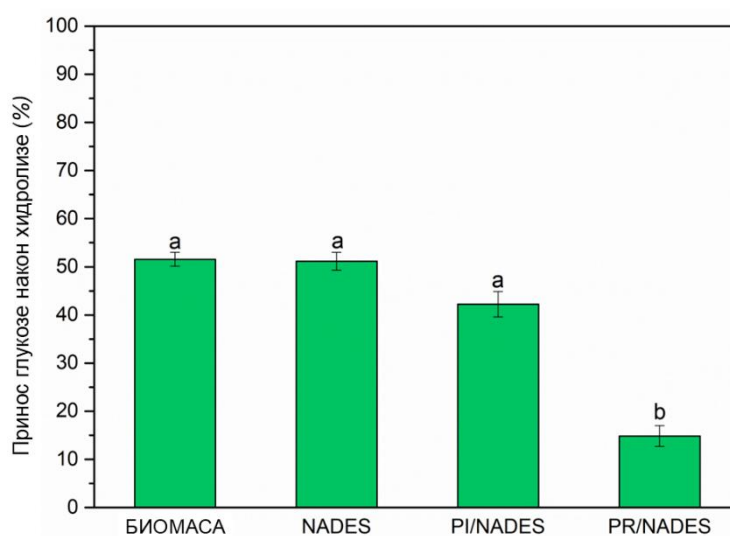
ефикасности третмана у плазма реактору неопходно је спровести засебну оптимизацију овог третмана. Током третмана, лигнин се одваја од угљено-хидратне компоненте услед кидања  $\beta$ -О-4 етарских веза и преводи се у једињења мање молекулске масе. Ове везе одликује висок садржај енергије, у опсегу од  $218 \text{ kJ mol}^{-1}$  до  $314 \text{ kJ mol}^{-1}$ , те је неопходно уложити више енергије у сам процес да би се постигла ефикаснија делигнификација веће масе узорка [391]. Како је скалирањем третмана у плазма реактору количина третиране биомасе повећана 15 пута, претпоставља се да процесни услови коришћени у случају третмана плазма иглом не обезбеђују довољну количину енергије потребну за постизање истог степена ефикасности. За постизање веће ефикасности делигнификације у плазма реактору, неопходно је извршити оптимизацију пре свега дужине трајања третмана, врсте и протока доводног гаса. Осим лигнина, третман биомасе еутектичким смешама на бази холин хлорида и млечне киселине утиче и на угљено-хидратну компоненту. Наиме, током третмана долази и до деполимеризације целулозе, као и до њеног делимичног растварања у еутектичкој смеси. До сличних промена долази и у случају хемицелулозе. Садржај основних компоненти лигноцелулозе у сировој и третираној биомаси приказан је на слици 4.35.



Слика 4.35. Садржај лигнина и структурних угљених хидрата у сировој биомаси, биомаси третираној еутектичком смешом (*NADES*), биомаси третираној комбинованим плазма игла/*NADES* третманом (*PI/NADES*) и биомаси третираној комбинованим нетермални плазма реактор/*NADES* третманом (*PR/NADES*)

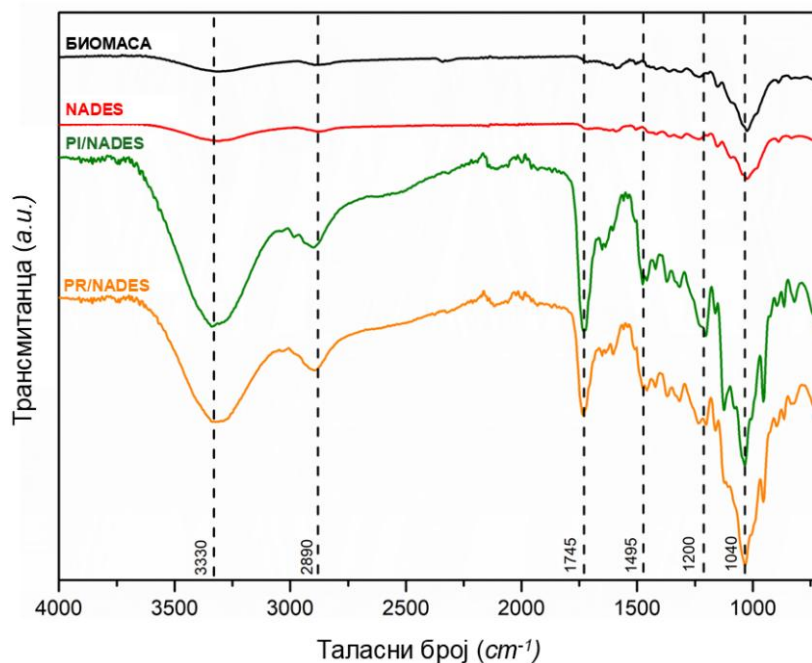
Након третмана садржај лигнина је био мањи у свим узорцима у односу на сирову биомасу, при чему је највише лигнина уклоњено у *PI/NADES* узорку, што је претходно утврђено применом методе са ацетил бромидом (слика 4.34.). Садржај лигнина растворљивог у киселинама, одређеног NREL методом, у сировој биомаси, *NADES*, *PI/NADES* и *PR/NADES* износио је  $1,4\% \pm 0,1\%$ ,  $1,3\% \pm 0,3\%$ ,  $0,6\% \pm 0,1\%$  и  $1,1\% \pm 0,2\%$ , респективно. За разлику од алкалног, комбиновани плазма/*NADES* третман је значајно утицао на растворљивост лигнина. Мањи садржај лигнина растворљивог у киселинама у узорцима изложеним плазми указује на промене у структури резидуалног лигнина изазваних реактивним врстама насталим током третмана плазмом, које су допринеле његовој растворљивости [195]. Ово је посебно изражено у узорку третираном плазма иглом под оптимизованим условима, из којег је уједно и уклоњено највише лигнина. Настале реактивне врсте су довеле до додатног закишељавања медијума и слабљења веза између лигнина и угљено-хидратне компоненте. Ниска рН вредност је утицала и на растворљивост целулозе и хемицелулозе. Током третмана плазмом хемицелулоза је делимично разграђена, при чему је чак 53% хемицелулозе уклоњено када је за третман коришћена плазма игла (*PI/NADES*), док је у плазма реактору уклоњено око 37% (слика 4.35). Такође, излагање биомасе плазми је довело и до уклањања значајне количине целулозе.

Конкретно, применом плазма игле уклоњено је чак 59% целулозе, док је применом плазма реактора уклоњено 30% целулозе. Целулоза и хемицелулоза које су током третмана уклоњене из биомасе заостају у течној фракцији. Разградња угљено-хидратне компоненте у киселој средини може довести и до стварања тзв. псеудо лигнина. Псеудо лигнин је ароматично једињење структуре сличне лигнину, богато карбонилним, карбоксилним и метокси групама [392]. У јако киселој средини (рН 1-2), карактеристичној за третман киселим еутектичким смешама, целулоза и хемицелулоза се разлажу до фурфурала и 5-хидроксифурфурала који се даље преводе у 3,8-дихидрокси-2-метил-хромон и 1,2,4-бензентриол, најзначајније прекурсоре за стварање псеудо лигнина [393]. Присуство псеудо лигнина, уз смањени садржај угљено-хидратне компоненте у третираној биомаси може утицати и на приносе редукујућих шећера добијених хидролизом третиране биомасе. Третирана биомаса је подвргнута 48-часовној ензимској хидролизи како би се испитала могућност примене ових третмана за повећање доступности угљено-хидратне компоненте ензимима. Принос глукозе у хидролизатима, добијен HPLC анализом, приказан је на слици 4.36.



Слика 4.36. Принос глукозе након 48-часовне хидролизе сирове биомасе, биомасе третиране еутектичком смешом (*NADES*) и биомасе третиране комбинованим плазма игла/*NADES* третманом (*PI/NADES*) и плазма реактор/*NADES* третманом (*PR/NADES*)

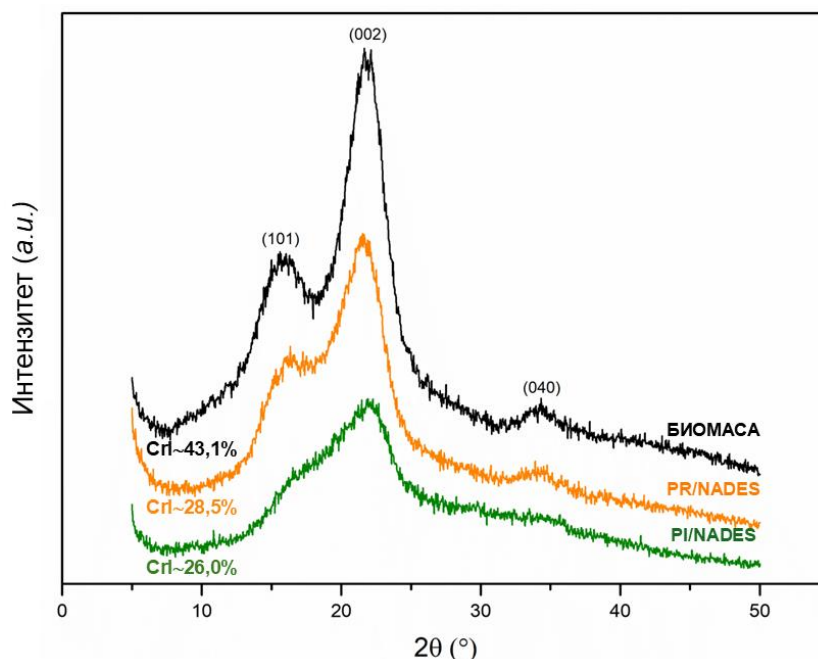
Иако је очекивано да уклањање лигнина допринесе ензимској хидролизи повећавајући принос шећера, приноси глукозе у хидролизатима третиране биомасе нису били виши у односу на хидролизат сирове биомасе. Овакав резултат последица је разградње угљено-хидратне компоненте услед третмана киселом еутектичком смешом (слика 4.35), али и присуства псеудо лигнина. Међутим, иако је у узорку третираном у плазма реактору остало више целулозе него у узорку третираном плазма иглом, принос глукозе у хидролизату *PR/NADES* је скоро три пута нижи од приноса глукозе у *PI/NADES*. Овај феномен је највероватније последица структурних промена које је проузроковао третман биомасе у плазма реактору. Како би се утврдиле структурне промене изазване сваки од примењених третмана, узорци су анализирани помоћу FTIR спектроскопије. Добијени спектри приказани су на слици 4.37.



Слика 4.37. FTIR спектри сирове биомасе, биомасе третиране еутектичком смешом (*NADES*) и биомасе третиране комбинованим плазма игла/*NADES* третманом (*PI/NADES*) и плазма реактор/*NADES* третманом (*PR/NADES*)

У узорку третираном само еутектичком смешом (*NADES*) није дошло до значајних промена у структури у односу на сирову биомасу, док су ове промене веома јасно изражене у узорцима третираним комбинованим плазма/*NADES* третманима. Ово објашњава и готово исти принос шећера и хемијски састав сирове биомасе и биомасе третиране применом еутектичке смеси (*NADES*). Повећање интензитета пика на око  $3\ 330\ \text{cm}^{-1}$  у узорцима третираним комбинованим плазма/*NADES* третманима указује на то да је у овим узорцима дошло до кидања водоничних веза, највероватније узрокованог применом плазме. Како је интензитет пика на око  $3\ 330\ \text{cm}^{-1}$  највећи након третмана нетермалном плазма иглом, у овом узорку је раскинуто највише водоничних веза. Ово потврђује и најнижа вредност НВІ у овом узорку (0,93) у односу на сирову биомасу (1,01) и преостале третиране узорке (0,99). Кидање водоничних веза довело је и до разарања кристалне структуре целулозе, односно смањења вредности ТСІ, која је била нижа у узорцима третираним нетермалном плазмом и износила је 0,90 у *PI/NADES*, односно 0,93 у *PR/NADES*, у односу на сирову биомасу у којој је овај индекс износио 0,98. Утицај нетермалне плазме на кристаличност третиране биомасе је додатно испитан и применом XRD-ја, о чему ће бити речи касније. Пикови на око  $1\ 745\ \text{cm}^{-1}$  и  $1\ 040\ \text{cm}^{-1}$  потврђују присуство хемицелулозе у третираним узорцима, која је изграђена доминантно од ксилана [333,334]. Осим тога, пикови на око  $1\ 200\ \text{cm}^{-1}$  и  $1\ 495\ \text{cm}^{-1}$  потичу од резидуалног лигнина који заостаје у биомаси након третмана, при чему се пик на  $1\ 200\ \text{cm}^{-1}$  односи на примарне алкоhole, а пик на  $1\ 495\ \text{cm}^{-1}$  на вибрације унутар ароматичног прстена лигнина [394]. Присуство хемицелулозе и лигнина у третираној биомаси претходно је потврђено и одређивањем садржаја главних компоненти лигноцелулозе применом NREL протокола (слика 4.35.). Већи интензитети карактеристичних пикова на  $3\ 330\ \text{cm}^{-1}$ ,  $1\ 745\ \text{cm}^{-1}$  и  $1\ 040\ \text{cm}^{-1}$  у *PI/NADES* узорку у односу на *PR/NADES* узорак указују на нарушавање структуре третиране биомасе применом нетермалне плазма игле у већој мери. Ово може бити резултат ефикасности примењеног третмана у мањим системима какви су коришћени у третманима са нетермалном плазма иглом. Осим тога, третман у плазма реактору је извођен при условима оптимизованим за употребу плазма игле, те би додатна оптимизација овог третмана за потребе реактора могла да доведе до погоднијих промена у структури биомасе током третмана. Осим структурних промена, на ефикасност ензимске хидролизе утиче и индекс кристаличности третиране

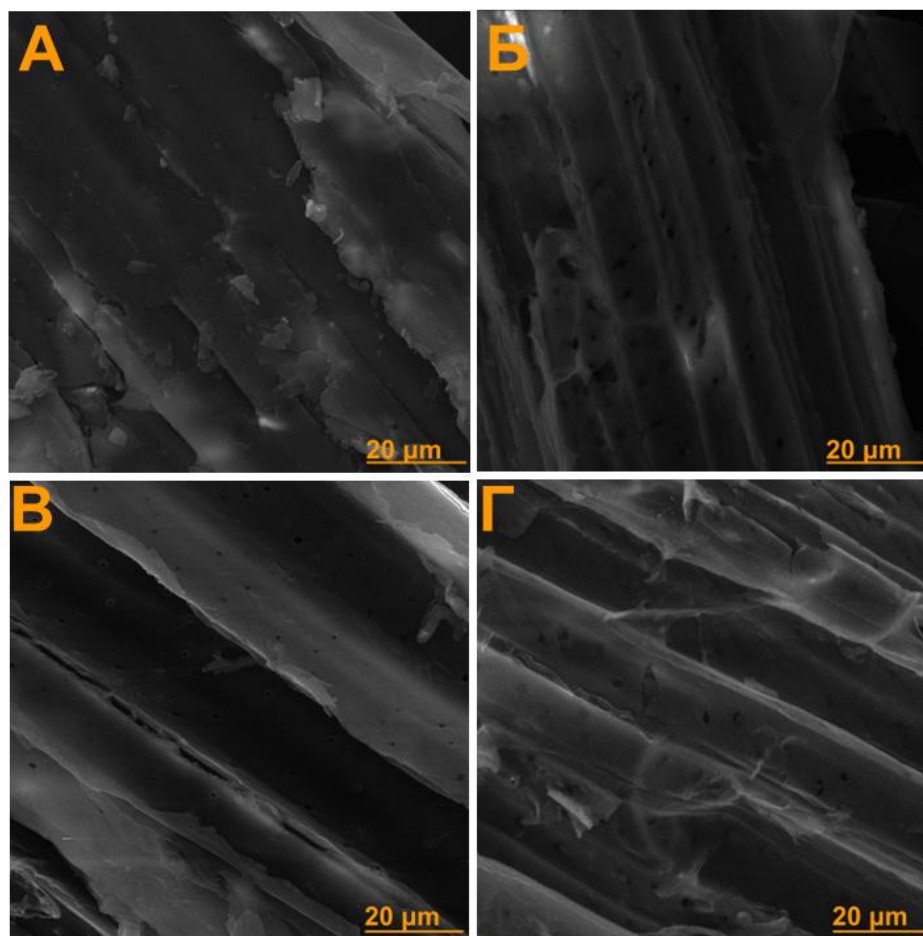
биомасе. Утицај примењених третмана на кристалинност третиране биомасе испитан је применом рендгенске дифракционе анализе. Добијени спектри приказани су на слици 4.38.



Слика 4.38. XRD спектри и индекс кристалинности сирове биомасе и биомасе третиране комбинованим плазма игла/NADES третманом (*PI/NADES*) и плазма реактор/NADES третманом (*PR/NADES*)

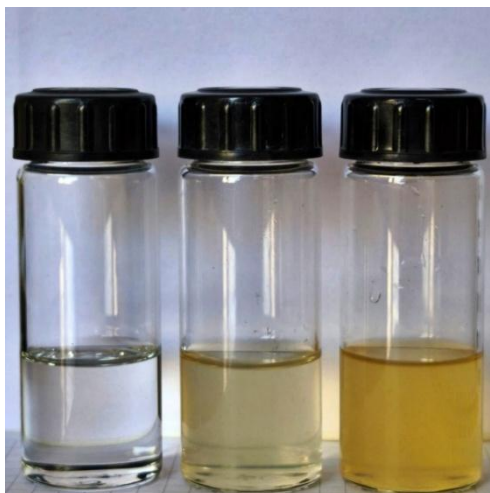
Карактеристични дифракциони пикови на око  $16,2^\circ$  и  $22,5^\circ$  потврђују да је сирова биомаса доминантно сачињена од целулозе I. Применом комбинованих плазма третмана долази до разарања кристалне решетке, смањујући индекс кристалинности у овим узорцима у односу на сирову биомасу. Индекс кристалинности је био најнижи у узорку третираном плазма иглом (*PI/NADES*), што је последица раскидања највише водоничних веза применом плазма игле. Највеће структурне промене у *PI/NADES* су претходно потврђене применом FTIR спектроскопије (слика 4.37.). Захваљујући нарушавању кристалног дела молекула целулозе, олакшан је продор ензима и омогућена несметана хидролиза, уз високим приносима глукозе у хидролизату *PI/NADES*, иако је у овом узорку садржај целулозе био најнижи. Разарање кристалне структуре целулозе у биомаси третираној комбинованим плазма/NADES третманима довело је и до промена у морфологији и порозности третиране биомасе. Ове промене испитиване су применом SEM-а, при различитим увећањима. Добијена микрографија приказана је на слици 4.39.

На површини сирове стабљике уочавају се додатне мање структуре неправилног облика, које највероватније представљају делове лигнина. Након сва три примењена третмана, већина ових структура је уклоњена. Осим тога, примећен је и повећан број пора на површини третиране биомасе у односу на сирову биомасу. Код узорака третираних само еутектичком мешом (*NADES*) и еутектичком мешом у плазма реактору (*PR/NADES*), ове поре су неправилног облика и променљиве величине, док се на неким местима уочавају и трагови „пучања“. Када је узорак третиран применом плазма игле (*PI/NADES*), распоред, облик и величина пора присутних на површини биомасе су униформнији. Такође, током третмана биомасе само еутектичком мешом, повећана порозност биомасе је примећена само локално, док применом плазме долази до стварања нових пора по читавој површини третираних узорака.



Слика 4.39. SEM микрографија сирове биомасе (А), биомасе третиране еутектичком смешом (NADES, Б) и биомасе третиране комбинованим плазма игла/NADES третманом (PI/NADES, В) и плазма реактор/NADES третманом (PR/NADES, Г), при увећању 2 000 пута

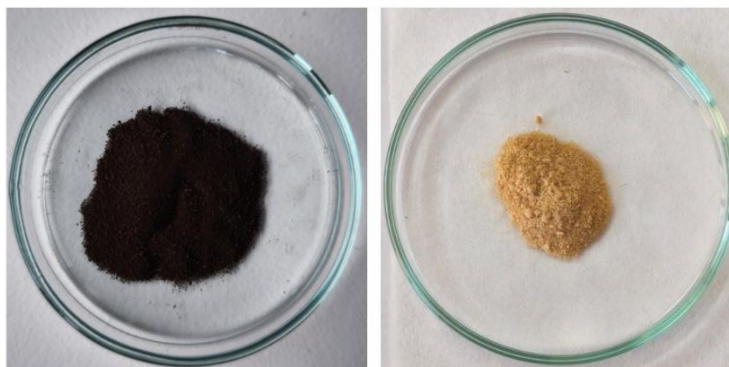
Након што је потврђено да нижи приноси шећера у хидролизатима третираних узорак нису последица структурних и морфолошких промена изазваних третманом, течне фракције заостале након третмана подвргнуте су анализи. Уобичајено се након третмана биомасе и сепарације фаза, еутектичке смеше изолују и рекуперирају, а потом поново употребљавају у третману биомасе. На овај начин могуће је једну исту смешу користити и до пет пута [395], чиме се посебно истиче одрживост третмана. Међутим, када се за третман користе смеше на бази киселина, током третмана долази и до делимичне хидролизе угљено-хидратне компоненте биомасе, што је претходно потврђено применом NREL протокола (слика 4.35). Укључивање ових смеша у нови циклус третмана биомасе би могло да доведе до даље разградње шећера, уз настанак инхибиторних једињења, попут фурфурала и 5-хидроксиметил фурфурала [396]. Иако су ова једињења вредни биорафинеријски полу-производи, уколико не настају у контролисаним условима као чиста једињења, већ у смеси инхибиторних споредних производа током третмана, значајно губе на квалитету и вредности. Стога у овој дисертацији није даље разматрана употреба исте еутектичке смеше у више циклуса третмана, како би се постигло максимално искоришћење биомасе. Пречишћавање смеша је заустављено након изоловања лигнина који је уклоњен током третмана и упаравања вишка воде и етанола коришћених у процесу раздвајања фаза. Као резултат тога добијене су рекуперисане смеше обогаћене шећерима. Изглед смеша рекуперисаних након третмана кукурузне стабљике само NADES-ом и након комбинованог плазма игла/NADES третмана приказан је на слици 4.40.



Слика 4.40. Изглед чисте природне дубоке еутектичке смеше (лево) и рекуперисане природне дубоке еутектичке смеше богате шећерима након третмана биомасе еутектичком смешом (средина), односно комбинованим плазма игла/NADES третманом (десно)

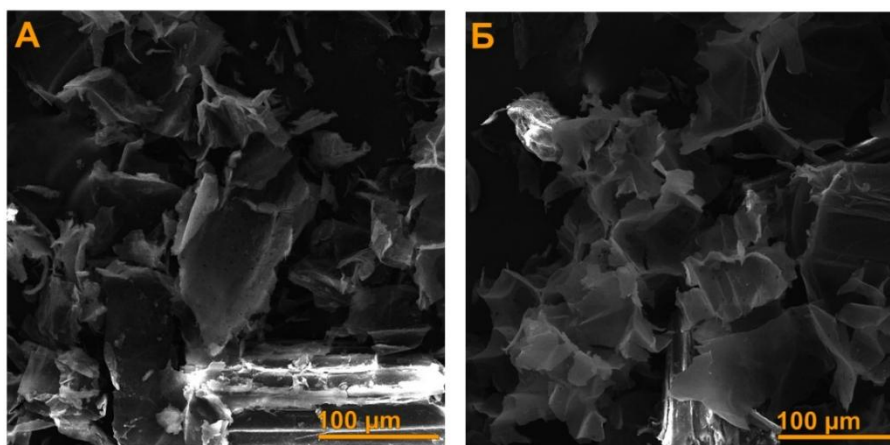
HPLC анализом је потврђено да смеше рекуперисане након NADES третмана и PI/NADES третмана садрже  $138,9 \text{ g L}^{-1}$  и  $175,1 \text{ g L}^{-1}$  глукозе, респективно. Рекуперисане смеше су затим подвргнуте ферментацији, како би се испитала могућност њиховог искоришћења за производњу секундарних метаболита. Zhang и сар. (2022) су раније потврдили овакав начин валоризације DES-а сачињеног од холин хлорида и глицерола, рекуперисаног након третмана тополе [397]. У њиховој студији је смеша ферментисана помоћу *Rhodotorula glutinis*, у циљу производње микробних липида [397]. Смеше рекуперисане у оквиру ове дисертације инокулисане су бактеријом млечне киселине, како би се њиховом ферментацијом обезбедила производња млечне киселине која би могла да се искористи за припрему нове смеше. Неутралисане и разблажене смеше су инокулисане и испитана је могућност раста *L. rhamnosus* у њима. Након 24 h, у смеси рекуперисаној након NADES третмана било је  $8,2 \pm 0,2 \text{ log CFU mL}^{-1}$  бактерија, док је PI/NADES смеша садржала  $7,4 \pm 0,1 \text{ log CFU mL}^{-1}$  бактерија. Иста култура је у MRS бујону, као контролном ферментационом медијуму, након 24 h достигла раст од  $8,5 \pm 0,1 \text{ log CFU mL}^{-1}$  бактерија, полазећи од  $7,1 \pm 0,2 \text{ log CFU mL}^{-1}$  у нултом часу у свим узорцима. Иако је *L. rhamnosus* показао слабији раст у PI/NADES смеси, могућност његовог преживљавања у рекуперисаним смешама је веома значајан. Такође, треба нагласити да су остварени резултати добијени без претходне оптимизације рекуперисаних смеша, као и без додавања извора азота или соли, који су неизоставни састојци стандардних хранљивих подлога. Како су рекуперисане смеше садржале високе концентрације шећера, а разблажене су свега три пута, могуће је да је дошло до делимичне инхибиције раста супстратом, нарочито у случају PI/NADES смеше. Оптимизацијом састава рекуперисаних смеша и услова ферментације, као примењеног инокулума може се додатно поспешити раст одабраних бактерија млечне киселине и тиме потенцијално повећати принос млечне киселине. Додатно, оптимизацијом смеша за раст других микробних врста могуће је добити спектар различитих високо вредних производа. Употребом рекуперисаних смеша као ферментационог медијума, вода и етанол коришћени за раздвајање фаза и изоловање лигнинске фракције заостају као једини отпадни токови третмана. И вода и етанол се могу рекуперисати и поново користити као растварачи техничког квалитета, било за раздвајање фаза у следећем циклусу третмана или у припреми биомасе за третман. На овај начин развијени третман се приближава тзв. „zero waste“ и „zero pollution“ концепту, који су међу основним принципима савремених биорафинеријских поступака [6]. Полазећи од сирове кукурузне стабљике, након третмана се добијају три фракције које је потенцијално могуће валоризовати – заостала третирана биомаса богата целулозом, рекуперисана смеша богата шећерима и лигнинска фракција.

Лигнинске фракције изоловане након третмана биомасе еутектичком смешом и комбинованим плазма игла/NADES третманом су светло браон боје. Иако су нешто тамније боје од лигнинских фракција изолованих након комбинованог плазма/алкалног третмана (слика 4.25), ове фракције су такође погодне за примену са органолептичког аспекта. Изглед фракције лигнина изоловане након комбинованог плазма игла/NADES третмана у односу на крафт лигнин приказан је на слици 4.41.



Слика 4.41. Изглед комерцијалног крафт лигнина (лево) и лигнинске фракције изоловане након комбинованог плазма игла/NADES третмана (десно)

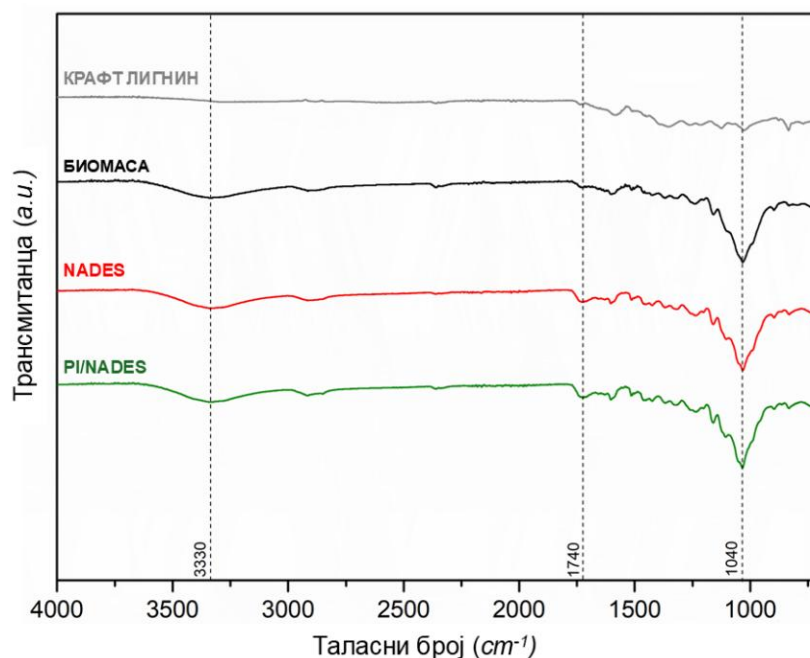
Морфологија изолованих лигнинских фракција анализирана је применом SEM-а. Добијена микрографија приказана је на слици 4.42.



Слика 4.42. SEM микрографија лигнинске фракције изоловане након третмана биомасе еутектичком смешом (NADES) и након комбинованог плазма игла/NADES третмана (PI/NADES), при увећању 500 пута

Применом третмана еутектичком смешом, самостално или у комбинацији са нетермалном плазмом, није дошло до стварања микро- и наночестица лигнина, као у случају примене алкалног и комбинованог плазма/алкалног третмана. Изоловане лигнинске фракције карактеришу структуре неправилних облика и глатке површине. На SEM микрографији лигнинских фракција уочавају се и структуре чија је површина порозна. Наиме, применом методе са ацетил бромидом утврђено је да изоловане фракције садрже  $35,9\% \pm 0,8\%$  лигнина у случају третмана еутектичком смешом, односно  $37,6\% \pm 2,2\%$  у случају комбинованог плазма игла/NADES третмана што је доста мали садржај лигнина у фракцији. Преосталих 62% до 64% чине угљено-хидратне компоненте, сугеришући да је током издвајања раствореног лигнина неопходно увести додатне кораке пречишћавања како би се добила што квалитетнија и чистија лигнинска фракција. Претходно је NREL протоколом (слика 4.35) и HPLC анализом потврђено да је угљено-хидратна компонента делимично растворена током третмана. Приликом изоловања лигнинске фракције према поступку описаном у одељку 3.5.4. дошло је и до

таложена дела растворене угљено-хидратне компоненте, која је затим изолована заједно са лигнином као лигнинска фракција. Присуство угљено-хидратне компоненте у изолованим лигнинским фракцијама се може потврдити применом FTIR спектроскопије. FTIR спектри комерцијалног крафт лигнина и лигнинских фракција изолованих након третмана биомасе еутектичком смешом и комбинованим плазма игла/NADES третманом приказани су на слици 4.44.



Слика 4.43. FTIR спектри комерцијалног крафт лигнина, лигнинске фракције изоловане након третмана биомасе еутектичком смешом (*NADES*) и након комбинованог плазма игла/*NADES* третмана (*PI/NADES*)

FTIR спектри лигнинских фракција изолованих након третмана биомасе еутектичком смешом (*NADES*) и након комбинованог плазма игла/*NADES* третмана (*PI/NADES*) се у великој мери поклапају са спектром комерцијалног крафт лигнина у опсегу од  $700\text{ cm}^{-1}$  до  $4\,000\text{ cm}^{-1}$ , уз изузетак у пиковима на око  $3\,300\text{ cm}^{-1}$ ,  $1\,740\text{ cm}^{-1}$  и  $1\,040\text{ cm}^{-1}$ . Повећани интензитети ових пикова у изолованим лигнинским фракцијама потичу од присуства хидроксилних група и ксилана, указујући на присуство целулозе и хемицелулозе у изолованим фракцијама које су остале везане за лигнин. Ово је потврђено и одређивањем садржаја лигнина у изолованим фракцијама применом методе са ацетил бромидом, али и применом SEM-а (слика 4.42.). Како би се испитао утицај овакве структуре и састава изолованих лигнинских фракција на биолошку активност, одређени су укупна концентрација полифенола и антиоксидативна активност изолованих фракција. Добијени резултати приказани су у табели 4.7.

Табела 4.7. Биолошка активност изолованих лигнинских фракција

Узорак	GAE ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	ABTS инхибиција (%)	ABTS TE ( $\text{mM mg}^{-1}$ )	DPPH инхибиција (%)	DPPH TE ( $\text{mM mg}^{-1}$ )
Крафт лигнин	181±18	25±1	1,1±0,0	53 ± 4	0,9±0,1
<i>NADES</i>	18±2	9±3	0,4±0,1	11 ± 3	0,2±0,1
<i>PI/NADES</i>	33±1	9±2	0,4±0,1	12 ± 1	0,2±0,0

*NADES* – третман еутектичком смешом, *PI/NADES* – комбиновани плазма игла/*NADES* третман, *GAE* – еквивалент галне киселине, *TE*

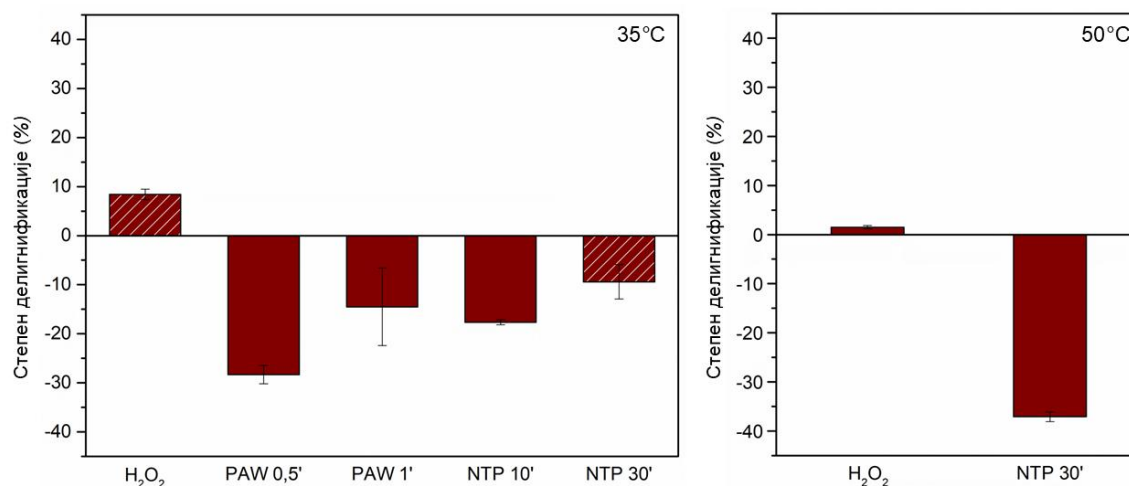
– еквивалент Тролокса

Концентрација укупних полифенола у екстрактима обе изоловане лигнинске фракције је значајно нижа у односу на екстракт крафт лигнина, али и у односу на екстракте лигнинских фракција изолованих након алкалног и комбинованог плазма/алкалног третмана (табела 4.4).

Нижа концентрација укупних полифенола је последица нижег садржаја лигнина у самим фракцијама, али и немогућности таложења лигнина мале молекулске масе, који остаје растворен у течной фракцији након третмана еутектичким смешама [398]. Ово се одразило и на антиоксидативну и антимикробну активност изолованих фракција. Лигнинске фракције нису инхибирале раст патогених микроорганизама. Остварени резултати указују на потребу за оптимизацијом изоловања и екстраховања лигнина на начин предложен у одељку 4.5. или применом другачијих приступа. Лигнинске фракције бољег квалитета се могу добити променом састава еутектичке смеше [399,400] или синергистичким деловањем смеше и лигнинолитичких ензима [401]. Лигнинолитички ензими се могу користити и као самостални третмани за делигнификацију биомасе, али су у оквиру дисертације испитане могућности комбиновања лигнолитичког ензима манган пероксидазе са нетермалном плазмом за постизање ефикасне делигнификације кукурузне стабљике.

#### 4.7. Комбиновани нетермална плазма/ензимски третман

Након испитивања утицаја различитих растварача, као и њиховог комбиновања са нетермалном плазмом, на делигнификацију кукурузне стабљике испитана је и ефикасност биолошког третмана, али и потенцијални синергизам овог третмана са нетермалном плазмом. Комбиновање плазме и ензимског третмана вршено је како би се испитала могућност примене различитих извора водоник пероксида неопходног за каталитички циклус манган пероксидазе (MnP). Плазма је примењена на два начина – за активацију воде током 0,5 min (*PAW 0,5'*) и 1 min (*PAW 1'*), која је затим коришћена у супстрату уместо пуфера и за директан третман воденог медијума у трајању од 10 min (*NTP 10'*), односно 30 min (*NTP 30'*), како би се у самом медијуму генерисао водоник пероксид. Осим тога, испитан је и утицај обogaћивања медијума 0,62 mM раствором водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) на ефикасност делигнификације. Остварени степен делигнификације након поменутих третмана приказан је на слици 4.44.



Слика 4.44. Степен делигнификације биомасе третиране манган пероксидазом на 35 °C, односно 50 °C, при чему је као извор водоник пероксида коришћен 0,62 mM водоник пероксид ( $H_2O_2$ ), плазма активирана вода (*PAW 0,5'*, *PAW 1'*) и водоник пероксид настао током третмана воденог супстрата плазмом (*NTP 10'*, *NTP 30'*)

Током ензимског третмана биомасе у присуству водоник пероксида из различитих извора, извођеном на 35 °C, до делигнификације је дошло само у узорку у коме је коришћен додати водоник пероксид у концентрацији 0,62 mM. Утврђено је да употреба плазме као извора водоник пероксида, било кроз активацију воде или директан третман супстрата, нема задовољавајућу ефикасност, што може бити последица недовољне концентрације водоник пероксида који је произведен у наведеним временским периодима или потенцијалног инхибиторног дејства других реактивних врста насталих током третмана плазмом на MnP. Могућност повећања ефикасности третмана је испитана и излагањем ензима оптималној

температури. У ову сврху одабран је узорак у коме је коришћен додати водоник пероксид и узорак који је претходно третиран плазмом 30 min (*NTP 30'*), као узорак у којем је генерисано највише водоник пероксида. Излагањем ензима оптималној температури уклоњено је свега  $1,5\% \pm 0,8\%$  лигнина у случају додатог водоник пероксида, док је у узорку претходно третираном плазмом уклоњен додатни део угљено-хидратне компоненте. Како на ефикасност третмана није утицала ни промена извора водоник пероксида ни промена температуре, за повећање ефикасности требало би испитивати даље повећање концентрације ензима и обогаћивање медијума. Додавање других ензима из групе лигнинолитичких ензима, додавање медијатора попут калцијум хлорида и сл., су неке од примењиваних стратегија у радовима других аутора. Chen и сар. (2023) су постигли уклањање око 65,9% лигнина из кукурузне стабљике након три дана на 40 °C, комбинованим третманом са манган пероксидазом, лаказом, глукоза оксидазом, уз додатну суплементацију калцијум хлоридом, манган сулфатом, полисорбатом 80 и оксалном киселином [402]. Zhang и сар. (2022) су испитивали могућност употребе комерцијалних лигнинолитичких ензима за разградњу лигнина изолованог из кукурузне стабљике [403]. Након инкубирања на 30 °C током 24 h применом манган пероксидазе разграђено је мање од 8% лигнина, док је применом лаказе уклоњено око 11,7% лигнина. Нешто ефикаснија делигнификација од 25,8% остварена је применом смеше ензима која је садржала лаказу, лигнин и манган пероксидазу. Синергистичко дејство лигнинолитичких ензима уочено је и применом сировог ензимског екстракта за делигнификацију шећерне багасе [404]. Додавањем 8% (v/v) сировог екстракта ензима, произведеног од стране *Pleurotus ostreatus*, у супстрат који се састојао од шећерне багасе и натријум малонатног пуфера уклоњено је око 33,5% лигнина током инкубације 48 h на 35 °C [404].

Иако почетна хипотеза о доприносу плазме ензимској делигнификацији кукурузне стабљике није доказана, добијени резултати указали су на могућност другачијег приступа у третману биомасе помоћу MnP. Применом ензимског третмана при предложеним процесним условима дошло је до делимичне разградње угљено-хидратне компоненте, уочене као негативна вредност степена делигнификације (слика 4.45). Иако спада у лигнинолитичке ензиме, MnP показује и целулазну и хемицелулазну активност. Min и сар. (2022) су потврдили ефикасну разградњу карбоксиметил целулозе (СМС) применом MnP у комбинацији са ацетатом [405], док су Liu и сар. (2023) показали да MnP испољава целулазну и хемицелулазну активност када се помеша са јабучном киселином [406]. Значајна разградња угљено-хидратне компоненте након овог третмана примећена је када је као извор водоник пероксида коришћена вода активирана 30 s (*PAW 0,5'*), у третману извођеном на 35 °C, и када је узорак претходно третиран плазмом 30 min (*NTP 30'*), у третману извођеном на 50 °C. Како би се утврдило да за разградњу угљено-хидратне компоненте одговорна MnP, експерименти су поновљени при истим условима, али без додатка ензима. Одређивањем степена делигнификације у овако третираним узорцима добијене су 50% ниже вредности него у присуству MnP, чиме је потврђена њена способност разградње угљено-хидратне компоненте. Ови резултати представљају основу за додатна испитивања и развој нових ензимских третмана лигноцелулозне биомасе, применом смеше целулолитичких ензима, попут Cellic STec 2, и лигнинолитичких ензима, попут MnP. Синергистичким дејством примењених ензима, при одговарајућим процесним условима, угљено-хидратна компонента би могла да буде потпуно хидролизована или би могло да дође до промене кинетике хидролизе. Примењеним третманом би се потенцијално добила течна фракција богата шећерима, која би одмах могла да се подвргне ферментацији, док би као чврст остатак заостала фракција богата лигнином. Синергистичко дејство MnP и целулаза је већ потврђено на целулозним супстратима [405], док у доступној литератури нема навода за употребу поменутог смеше ензима на лигноцелулозној биомаси.

Даље развијање синергистичког ензимског третмана лигноцелулозне биомасе превазилази оквире ове докторске дисертације, те је оно планирано за будућа истраживања.

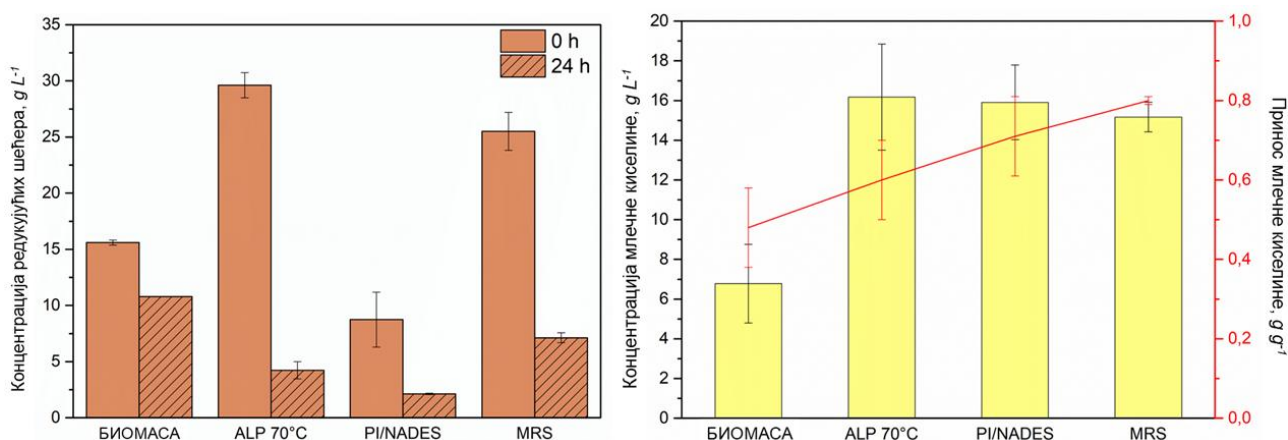
Пошто су претходно развијени третмани при којима је остварен врло висок степен делигнификације, одабрани су најпогоднији узорци на којима је испитана даља биотехнолошка валоризација угљено-хидратне фракције.

#### 4.8. Валоризација третиране биомасе

Главни критеријум за процену ефикасности третмана развијених у овој дисертацији било је уклањање што веће количине лигнина присутног у сировој биомаси. Највиши степен делигнификације остварен је применом комбинованог нетермална плазма/алкалног и нетермална плазма/природне дубоке еутектичке смеше третмана. Иако максимални постигнути степени делигнификације нису нужно узроковали остваривање највиших приноса шећера након 48-часовне ензимске хидролизе, при одабиру најбољих узорака за даљу валоризацију у обзир је узето још неколико фактора. Наиме, као два репрезентативна узорка одабране су биомаса третирана применом комбинованог плазма/алкалног третмана на 70 °C (*ALP 70 °C*) и комбинованог плазма игла/*NADES* третмана (*PI/NADES*). Критеријум за њихов одабир је био и висок принос лигнинских фракција изолованих након третмана. Осим бољих морфолошких и структурних карактеристика, ове фракције су биле погодније и са аспекта биолошке активности. На овај начин омогућена је валоризација свих фракција лигноцелулозне биомасе добијених након третмана потпомогнутих нетермалном плазмом. Валоризација третиране биомасе вршена је кроз ферментационе процесе, у циљу производње млечне киселине, биоетанола и биометана.

##### 4.8.1. Млечно-киселинска ферментација

Одабрани узорци третиране биомасе подвргнути су млечно-киселинској ферментацији, у циљу процене њиховог искоришћења као супстрата за производњу млечне киселине. Сирова биомаса је истовремено ферментисана како би се испитао утицај примењених третмана на повећање приноса млечне киселине. Ферментацији је претходила ензимска хидролиза узорака, на начин описан у одељку 3.6. Добијени хидролизати су обogaћени изворима азота и солима, неопходним за раст бактерија млечне киселине, а затим су инокулисани преконоћном културом *L. rhamnosus*, према протоколу описаном у одељку 3.8.1. *MRS* бујон, као стандардна подлога за раст бактерија млечне киселине, инокулисан је при истим условима и коришћен као контролни узорак. Ферментација је трајала 24 h, на 37 °C, уз контролисање и подешавање рН вредности. Концентрација редукујућих шећера, број живих ћелија, концентрација и принос млечне киселине одабрани су као параметри процене ефикасности млечно-киселинске ферментације. Добијени резултати приказани су на слици 4.45.



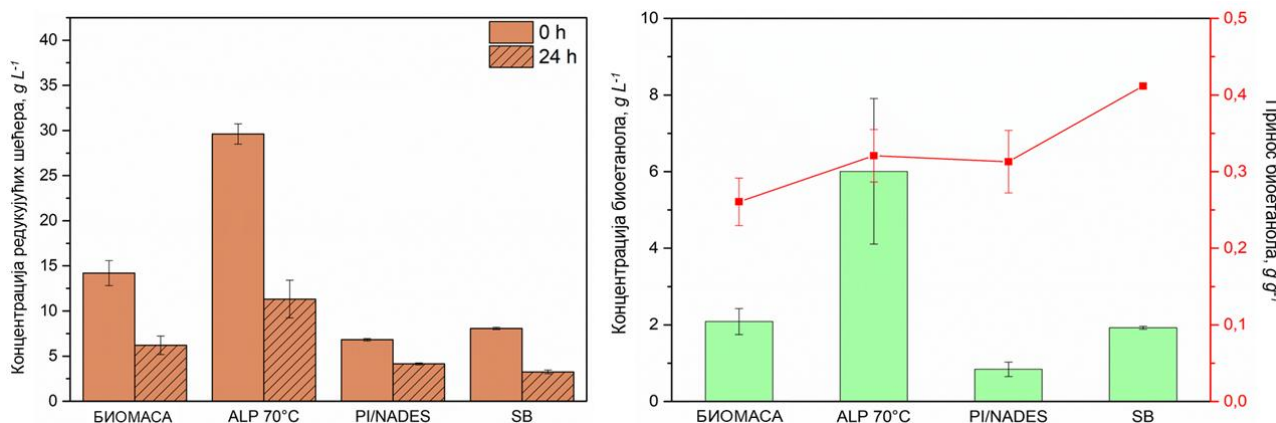
Слика 4.45. Промена концентрација редукујућих шећера и принос млечне киселине добијен ферментацијом хидролизата сирове биомасе, биомасе третиране комбинованим плазма/алкалним третманом на 70 °C (*ALP 70 °C*) и комбинованим плазма игла/*NADES* третманом (*PI/NADES*), у односу на контролни узорак (*MRS*)

Највећи принос млечне киселине ( $0,8 \text{ g g}^{-1} \pm 0,0 \text{ g g}^{-1}$ ) остварен је у MRS бујону, што је било и очекивано за стандардну подлогу која обезбеђује оптималне услове за раст и метаболизам бактерија млечне киселине. Ферментацијом *PI/NADES* хидролизата произведено је  $0,7 \text{ g g}^{-1} \pm 0,1 \text{ g g}^{-1}$  млечне киселине, док је ферментацијом *ALP 70 °C* хидролизата произведено  $0,6 \text{ g g}^{-1} \pm 0,1 \text{ g g}^{-1}$  млечне киселине. Наведени приноси су нижи од приноса оствареног у MRS бујону, иако је ферментацијом *PI/NADES* и *ALP 70 °C* хидролизата добијена готово иста концентрација млечне киселине као и ферментацијом MRS бујона. Ове разлике потичу од врсте и удела шећера присутних у ферментационим медијумима. Приноси су рачунати и изражени на основу концентрације редукујућих шећера. У MRS бујону је од редукујућих шећера присутна само глукоза, док су у хидролизатима третиране биомасе присутне и пентозе настале хидролизом хемицелулозе. Како би се добила реалнија слика о оствареном приносу, требало би анализирати ферментационе медијуме применом HPLC анализе, те приликом израчунавања приноса узети у обзир само концентрацију глукозе. Међутим, детаљна анализа састава хидролизата није разматрана у оквиру ове дисертације, јер је циљ млечно-киселинске ферментације било само испитивање могућности оваквог искоришћења третиране биомасе, али не и њена даља оптимизација. Такође, у току експерименталног рада није извршена комплетна оптимизација састава подлоге нити услова ферментације. У односу на MRS бујон као стандардни хемијски дефинисан медијум, хидролизати и подлоге на бази хидролизата нису у потпуности дефинисаног састава и могуће је присуство једињења која смањују ефикасност конверзије ферментабилних шећера у млечну киселину. У литератури нису испитиване млечно-киселинске ферментације на лигноцелулозним супстратима добијеним комбинованим третманима са плазмом, али одређени резултати су доступни за третмане са NADES и алкалним растворима. Након третмана стабљике раствором натријум хидроксида у високопритисном реактору, у ферментацији је остварен је принос млечне киселине од  $0,92 \text{ g g}^{-1}$  [267], док је третманом еутектичком смешом на бази холин хлорида и глицина у наредном кораку ферментације произведено  $0,96 \text{ g g}^{-1}$  млечне киселине [269]. Наведени резултати потврђују да је применом одабраних третмана могуће постићи скоро потпуну конверзију глукозе до млечне киселине. Нижи приноси млечне киселине остварени у овој дисертацији у односу на поменуте последица су услова при којима је ферментација извођена. Циљ подвргавања хидролизата млечно-киселинској ферментацији било је испитивање могућности искоришћења третиране биомасе за добијање млечне киселине, као примера биотехнолошког поступка са бактеријама у којима би се искористили хидролизати добијени у развијеним поступцима. Ферментација је извођена при условима који су претходно оптимизовани за млечно-киселинску ферментацију на скробним и отпадним супстратима из прехранбене индустрије [307]. Међутим, за постизање максималне конверзије глукозе и добијање виших приноса млечне киселине, потребно је прилагодити сам поступак ферментације одговарајућим узорцима. Након 24-часовне ферментације при условима коришћеним у овој дисертацији, просечан број живих ћелија *L. rhamnosus* износио је  $9,3 \pm 0,4 \log \text{ CFU mL}^{-1}$ , али продужење трајања ферментације до 48 h није допринело повећању приноса млечне киселине. Ферментацијом хидролизата биомасе третиране плазма/алкалним третманом (*ALP 70 °C*) произведено је 25% више млечне киселине у односу на сирову биомасу, док је применом плазма игла/NADES третмана (*PI/NADES*) принос млечне киселине повећан за чак 48% у односу на хидролизат сирове биомасе. Иако нису остварени виши приноси млечне киселине, потврђено је да се применом третмана унапређује искоришћење биомасе и да су приноси слични са резултатима на супстратима друге генерације који се разматрају за индустријску намену. Такође, развијени третмани су значајно краћи, што доприноси свеукупној одрживости производње млечне киселине.

#### 4.8.2. Алкохолна ферментација

Биоетанол друге генерације (2Г), тј. биоетанол произведен на сировинама друге генерације је један од најважнијих биорафинеријских производа. Како се и кукурузна стабљика

убраја у ове сировине, њени хидролизати су коришћени у алкохолној ферментацији применом *S. cerevisiae*. Хидролизати добијени након ензимске хидролизе биомасе третиране плазма/алкалним и плазма/NADES третманом су обogaћени изворима азота потребним за раст квасаца, а потом и инокулисани преконоћном културом *S. cerevisiae*, према протоколу описаном у одељку 3.8.2. Хидролизат сирове биомасе је ферментисан како би се испитао утицај примењених третмана на повећање приноса биоетанола, док је сладни бујон коришћен као контролни узорак. Ферментација је извођена 24 h на 30 °C, уз контролу рН вредности, при претходно дефинисаним условима [318]. Концентрација редукујућих шећера, број живих ћелија, концентрација и принос биоетанола одабрани су као параметри процене ефикасности алкохолне ферментације. Добијени резултати приказани су на слици 4.46.

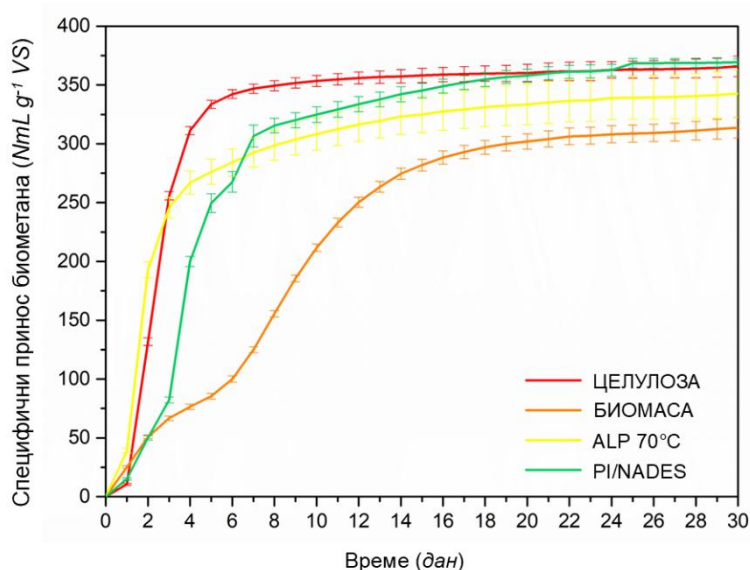


Слика 4.46. Промена концентрације редукујућих шећера и принос биоетанола добијен ферментацијом хидролизата сирове биомасе, биомасе третиране комбинованим плазма/алкалним третманом на 70 °C (*ALP 70 °C*) и комбинованим плазма игла/NADES третманом (*PI/NADES*), у односу на контролни узорак (*SB*)

Оба испитивана третмана су се показали упоредивим у погледу ефикасности алкохолне ферментације, уз остварени принос биоетанола од  $0,3 \text{ g g}^{-1} \pm 0,1 \text{ g g}^{-1}$  у оба случаја. Остварени приноси биоетанола након ферментације третираних узорака су 1,2 пута већи у односу на сирову биомасу, чиме је потврђен значај примене третмана који претходе искоришћењу биомасе. Као и у случају млечно-киселинске ферментације, неслагања у односу остварене концентрације и приноса биоетанола добијених ферментацијом хидролизата третиране биомасе и сладног бујона као стандардне подлоге потичу од различитог састава и врсте шећера у ферментационим медијумима. За постизање максималне конверзије ферментабилних шећера у хидролизату неопходно је спровести оптимизацију услова ферментације, на шта указује и принос биоетанола у сладном бујону ( $0,4 \text{ g g}^{-1} \pm 0,0 \text{ g g}^{-1}$ ), који је износио 80% теоријског приноса. Такође, одабиром генетички модификованих микроорганизама, способних да ферментишу и пентозе, могуће је додатно повећати приносе биоетанола и тиме поспешити искоришћење третиране биомасе. Ипак, остварени приноси су били у складу са литературним приносима оствареним када је кукурузна стабљика третирана при сличним процесним условима. Подвргавањем стабљике алкалном третману у присуству натријум хидроксида и даљој хидролизаци, произведено је  $0,46 \text{ g g}^{-1}$  биоетанола [272]. Третманом стабљике еутектичком смешом која се састојала од холин хлорида и глицерола остварен је принос биоетанола од 54,86%, који је највиши у односу на смешу у чији су састав улазили други НВД [275]. Имајући у виду све погодности развијених третмана, ово истраживање је показало да би уз одговарајуће повећање размера производње хидролизати кукурузне стабљике могли да буду погодан супстрат за ферментацију бактеријама и/или квасцима са циљем производње хемикалија и биогорива.

### 4.8.3. Анаеробна дигестија

Након потврђивања могућности употребе одабраних третираних узорака као извора угљеника у ферментационим процесима, за добијање млечне киселине и биоетанола, третирана биомаса је коришћена и као супстрат за добијање биометана у процесу анаеробне дигестије. За разлику од млечно-киселинске и алкохолне ферментације, анаеробна дигестија није захтевала претходну хидролизу третираних узорака, већ су ови узорци коришћени као чврсте фракције. За анаеробну дигестију је коришћен инокулум из постројења за третман отпадних вода. Након одређивања садржаја укупних и испарљивих чврстих материја у инокулуму и одабраним узорцима, узорци су помешани са инокулумом и анаеробна дигестија је покренута према протоколу описаном у одељку 3.8.3. Дигестија је трајала 30 дана и извођена је у аутоматизованом систему, те су температура и рН вредност одржаване константним. Сирова биомаса је такође подвргнута дигестији, како би се испитао утицај примењених третмана на повећање приноса биометана, док је целулоза коришћена као контрола. Специфичан принос биометана током 30 дана приказан је на слици 4.47.



Слика 4.47. Специфични принос биометана током 30 дана анаеробне дигестије сирове биомасе, биомасе третиране комбинованим плазма/алкалним третманом на 70 °C (*ALP 70 °C*) и комбинованим плазма игла/NADES третманом (*PI/NADES*)

Анаеробном дигестијом третиране биомасе остварени су високи приноси биометана. Применом комбинованог плазма/алкалног третмана, принос биометана остварен након 30 дана ( $365,7 \pm 8,8 \text{ N mL g}^{-1} \text{ VS}$ ) био је свега 7% нижи од приноса оствареног дигестијом чисте целулозе ( $365,7 \pm 8,8 \text{ N mL g}^{-1} \text{ VS}$ ), док је комбиновани плазма игла/NADES третман довео до повећања приноса биометана у односу на целулозу ( $369,4 \pm 2,9 \text{ N mL g}^{-1} \text{ VS}$ ). Иако је *PI/NADES* третманом остварен висок степен делигнификације, у третираној биомаси је осим целулозе била присутна и мања количина лигнина (слика 4.35) који није могуће превести у биометан. Производња готово исте количине биометана дигестијом овако третиране биомасе као у случају чисте целулозе могућа је захваљујући псеудо лигнину присутном у третираној биомаси. Иако механизам интеракције псеудо лигнина и микроорганизама одговорних за анаеробну дигестију није потпуно познат, његов позитиван утицај на производњу биометана је и раније потврђен [407]. За разлику од псеудо лигнина, лигнин природно присутан у биомаси негативно утиче на анаеробну дигестију, ограничавајући доступност угљено-хидратне компоненте микроорганизама продуцентима биометана. Применом одговарајућег третмана може се повећати индекс биодеградабилности (BDI) биомасе и тиме остварити већи принос биометана. Третмани развијени у оквиру ове дисертације значајно су повећали BDI, чиме је принос биометана након *ALP 70 °C* третмана повећан за 9%, а након *PI/NADES* третмана за 18%, у

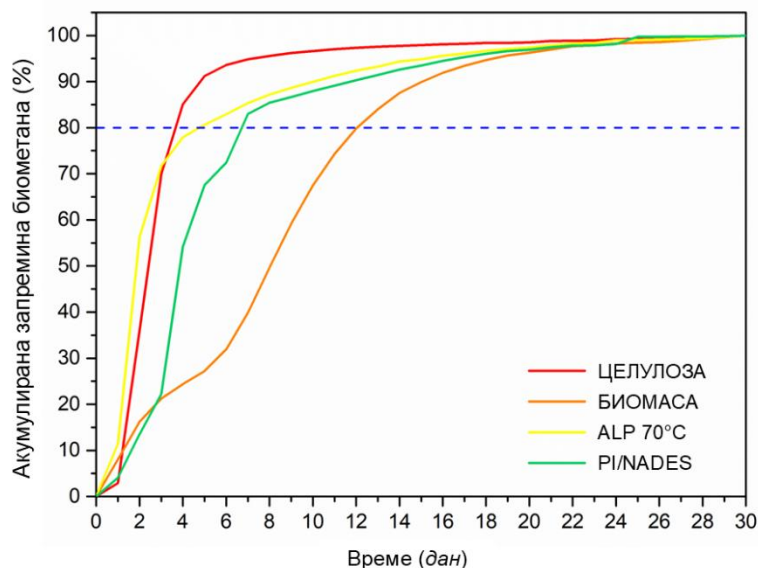
односу на сирову биомасу. Сличан ефекат третмана на повећање приноса биометана постигнут је и применом алкалне еутектичке смеше, сачињене од етилен гликола, натријум хидроксида и урее [279]. Принос биометана добијеног анаеробном дигестијом кукурузне стабљике третиране овом смешом повећан је за 16% у односу на сирову кукурузну стабљику [279]. Теоријски и остварени приноси биометана, као и BDI сирове и третиране биомасе коришћене у овој дисертацији приказани су у табели 4.8.

Табела 4.8. Теоријски и остварени принос биометана и индекс биодеградабилности сирове биомасе, биомасе третиране комбинованим плазма/алкалним третманом на 70 °C (*ALP 70 °C*) и комбинованим плазма игла/NADES третманом (*PI/NADES*)

Узорак	TBMP ( $N mL g^{-1} VS$ )	BMP ( $N mL g^{-1} VS$ )	BDI (%)
Биомаса	451,2±5,1	313,7±8,8 <sup>b</sup>	69,5±1,9 <sup>d</sup>
<i>ALP 70 °C</i>	419,2±14	342,6±20 <sup>ab</sup>	81,7±4,9 <sup>c</sup>
<i>PI/NADES</i>	461,4±3,3	369,4±2,9 <sup>a</sup>	80,1±1,2 <sup>c</sup>

TBMP – теоријски принос биометана; BMP – специфични принос биометана након 30 дана; BDI – индекс биодеградабилности

За разлику од млечно-киселинске и алкохолне ферментације које, у зависности од процесних услова, представљају брзе процесе и веома ретко трају дужи од пет дана [408], анаеробна дигестија се одвија дужи, од 30 дана до чак 60 дана [409]. Дуго трајање овог процеса негативно утиче на свеукупну енергетску ефикасност биорафинеријског поступка, резултирајући повећањем оперативних трошкова. Увођењем појма „техничко време дигестије“ олакшана је процена одрживости биорафинеријског поступка још у фази његовог развоја. Техничко време дигестије представља време потребно да се произведе 80% максималне количине произведеног биометана [410]. Мања вредност овог параметра указује на већу ефикасност самог процеса. На слици 4.48 приказана је акумулирана запремина произведеног биометана по данима, на основу које је одређено и техничко време дигестије сваког од узорака.



Слика 4.48. Акумулирана запремина биометана по дану током анаеробне дигестије сирове биомасе, биомасе третиране комбинованим плазма/алкалним третманом на 70 °C (*ALP 70 °C*) и комбинованим плазма игла/NADES третманом (*PI/NADES*)

Да би се произвело 80% укупне запремине биометана из сирове биомасе, анаеробна дигестија треба да траје 13 дана. Применом третмана, дужина трајања анаеробне дигестије се може преполовити. Техничко време дигестије биомасе третиране *ALP 70 °C* третманом износило је 5 дана, док је применом *PI/NADES* третмана износило 7 дана. Ови резултати потврђују могућност развијања нових биорафинеријских поступака заснованих на примени

третмана развијених у оквиру ове дисертације. Међутим, успостављању нових биорафинеријских поступака претходи детаљна процена одрживости свих фаза процеса.

#### 4.9. Процена одрживости развијених третмана

Након развијања и оптимизације третмана кукурузне стабљике и процене њихове ефикасности са аспекта делигнификације, извршена је и процена енергетске ефикасности и исплативости ових третмана. Процесни параметри при којима је постигнут највиши степен делигнификације су узети као репрезентативни пример за сваки од развијених третмана. Третман кукурузне стабљике Мп пероксидазом није узет у разматрање због изузетно ниске ефикасности. Најпре је одређена количина енергије коју је потребно уложити у извођење третмана. Затим је извршена процена трошкова извођења третмана на основу цене струје и реагенаса који су коришћени у третману. Све вредности су прерачунате и изражене за третман 1 g биомасе. Добијени резултати приказани су у табели 4.9.

Табела 4.9. Процена трошкова третмана потпомогнутих нетермалном плазмом за делигнификацију кукурузне стабљике

Третман *	Уложена енергија ( $kW \cdot h$ )	Цена уложене енергије ( $pcd$ )	Цена утрошеног аргона ( $pcd$ )	Цена утрошених реагенаса ( $pcd$ )	Укупна цена третмана ** ( $pcd$ )
Водени	9,26	119,71	29 538	1,52	29 668,5
Фентон	9,25	119,58	14 769	7,01	14 904,8
Алkalни	1,10	14,22	4 923	1,91	4 940,2
NADES	0,0085	0,11	14 769	166,0	14 935,1

\* Комбиновани плазма/водени третман (60 min); комбиновани плазма/Фентон третман ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O:H_2O_2=1:25$ , 30 min); комбиновани плазма/алкални третман ( $70^\circ C$ , 10 min); комбиновани плазма/NADES третман ( $ChCl:LA=1:2$ , 10% воде, 30 min)

\*\* Укупна цена за третман 1 g кукурузне стабљике

Када је реч о енергији коју је потребно уложити за извођење третмана, комбиновани нетермална плазма/NADES третман се показао као најефикаснији. Овај третман је извођен на собној температури и трајао је само 30 min. Са друге стране, комбиновани третмани са водом и са Фентоновим реагенсом су значајно захтевнији, са хиљаду пута више уложене енергије. Ово је последица накнадне инкубације након третмана плазмом, која је трајала 24 h, уз благо загревање на  $35^\circ C$ . Иако је сам третман плазма иглом енергетски повољан ( $0,3-2 W \cdot h$ ), најзначајнији удео у укупној цени третмана има утрошени аргон. Аргон се користи као доводни гас током третмана плазмом, те се на укупну цену третмана може утицати скраћењем дужине третмана плазмом. Захваљујући три пута краћем третману плазмом током комбинованог нетермална плазма/алкалног третмана у односу на комбиновани нетермална плазма/NADES и нетермална плазма/Фентон третман, укупна цена алкалног третмана је три пута нижа у односу на друга два третмана. Такође, на укупну цену третмана значајан утицај има и одабир реагенаса. Еутектичке смеше представљају комплекснији медијум од воде и водених раствора водоник пероксида и соли гвожђа, те су и трошкови употребљених реагенаса највећи у плазма/NADES третману. Међутим, осим економског, одабир реагенаса је важан и са еколошког аспекта.

Еколошки аспект се односи пре свега на количину отпада и загађење који настају током извођења третмана [411]. Третирана биомаса се након третмана Фентоновим реагенсом и алкалног третмана испира оксалном, односно хлороводоничном киселином. Додатно, изоловање хемицелулозне и лигнинске фракције захтева подешавање рН вредности, чиме се у систем уводе нови реагенси. На овај начин настаје отпадна вода коју је потребно неутралисати пре одлагања. Употребом еутектичких смеша је омогућено искоришћење свих фракција након третмана. Наиме, за рекулерацију угљено-хидратне компоненте и издвајање лигнинске фракције се у систем уводе 96% етанол и вода. Након изоловања лигнина, вода и етанол се

могу уклонити упаравањем и користити у новом циклусу третмана. Истовремено, рекуперисана еутектичка смеша се користи као ферментациони медијум, чиме се обезбеђује циркуларност процеса. Третман еутектичким смешама развијен у овој дисертацији је најједноставнији за извођење, најкраћи, енергетски најмање захтеван и еколошки прихватљив. Осим тога, након овог третмана остварен је највиши принос биометана. Стога је овај третман одабран као модел за скалирање процеса у плазма реактору и процену утицаја скалирања на укупне трошкове самог процеса.

Применом плазма реактора, размере третмана су увећане 15 пута. Третман је извођен при истим условима као и применом плазма игле, на начин описан у одељку 3.5.4. Укупни трошкови извођења третмана у плазма реактору су израчунати на исти начин као у случају плазма игле (табела 4.9). За третман 15 g кукурузне стабљике у плазма реактору неопходно је издвојити 112 743,73 рсд, што је дупло мање новца него што би било потребно издвојити за третман исте количине стабљике применом плазма игле. Анаеробном дигестијом биомасе третиране у плазма реактору произведено је 483,76 N mL g<sup>-1</sup> VS, што је за 54% више у односу на сирову биомасу. Енергија биометана износи 35,8 J mL<sup>-1</sup>, док је за третман једног килограма стабљике у плазма реактору неопходно уложити 0,465 kW·h, односно 1,67 MJ [282]. На основу ових параметара израчуната је количина енергије коју је могуће произвести анаеробном дигестијом третиране биомасе. Добијене вредности приказане су у табели 4.10.

Табела 4.10. Енергетски биланс производње биометана из третиране кукурузне стабљике

Супстрат	Произведена енергија (MJ kg <sup>-1</sup> )	Енергија уложена у третман (MJ kg <sup>-1</sup> )	Нето енергија (MJ kg <sup>-1</sup> )
Сирова биомаса	10,18	-	10,18
PR/NADES	15,69	1,67	14,02

Применом третмана остварен је пораст произведене енергије од 38% у односу на сирову кукурузну стабљику. Такође, нето енергија добијена анаеробном дигестијом третиране стабљике је 8,4 пута већа од количине енергије коју је потребно уложити у третман. Иако су остварени резултати задовољавајући, даљом оптимизацијом самог третмана је могуће повећати принос биометана, односно произведене енергије. Комбинованим плазма/Фентон третманом у истом реактору, остварен је пораст производње енергије од 25% у односу на сирову биомасу [412], док је воденим третманом у овом реактору принос енергије повећан за 18% [282]. Овим је потврђен значај употребе еутектичких смеша у третману биомасе. Анализирани критеријуми представљају оквирну процену одрживости комбинованог нетермална плазма/NADES третмана при наведеним условима. За детаљну процену применом техно-економске анализе и анализе животног циклуса неопходно је додатно скалирање процеса.

## 5. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације развијена су четири третмана лигноцелулозне биомасе потпомогнута нетермалном плазмом. Третмани су развијени тако да се њиховом применом оствари највиши степен делигнификације третиране биомасе. Након третмана извршено је фракционисање и издвајање добијених фракција. Изоловане целулозна, хемицелулозна и лигнинска фракција су окарактерисане са аспекта хемијског састава, структурних и морфолошких промена изазваних третманом. Потом су одабране целулозне и лигнинске фракције погодне за валоризацију. Искоришћење целулозне фракције је потврђено кроз ензимску хидролизу, млечно-киселинску ферментацију, алкохолну ферментацију и анаеробну дигестију. Лигнинске фракције су окарактерисане са аспекта биолошке активности, одређивањем антиоксидативне и антимикробне активности. Затим је одабран модел третман који је скалиран применом нетермалног плазма реактора са диелектричним баријерним пражњењем (DBD). По завршетку третмана, процењена је његова ефикасност карактеризацијом третиране биомасе и њеним искоришћењем као супстрата за добијање биометана. На крају, извршена је оквирна процена одрживости развијених третмана. Одрживост је процењена са економског и енергетског аспекта, имајући у виду потрошњу енергије и реагенаса потребних за третман, као и количину произведене енергије.

Први део истраживања подразумевао је хемијску карактеризацију нетермалне плазме на атмосферском притиску, која је у овој дисертацији коришћена у конфигурацији плазма игле. Утврђен је профил стабилности најзначајнијих карактеристика плазма активираних воде током различитих временских интервала. Утврђено је да се применом плазме добија активирани вода обогаћена реактивним врстама, пре свега хидроксил радикалом и водоник пероксидом, док су јони нитрита и нитрата присутни у нижим концентрацијама. Овиме је потврђена могућност употребе плазме као *in situ* извора реактивних врста у воденим медијумима које су значајне за разградњу лигноцелулозне биомасе, пре свега за уклањање лигнина.

Производњом реактивних врста *in situ* у воденом медијуму може се уклонити и до 49% лигнина из кукурузне стабљике за 1 h, без додавања реагенаса. Ипак, овакав третман не доприноси биотехнолошком искоришћењу пре свега угљено-хидратне компоненте сировине значајно, јер ензимском хидролизом третиране биомасе није уочено повећање приноса шећера у односу на сирову биомасу. Закључено је да је неопходно извршити модификације третмана комбиновањем плазме са реагенсима који су се претходно показали погодним за делигнификацију.

У наредном кораку истраживања, развијен је биомиметички третман биомасе заснован на синергистичком дејству плазме и Фентон третмана, по узору на разградњу лигнина коју у природи врше гљиве беле трулежи. Употребом Фентоновог реагенса, сачињеног од  $\text{Fe}^{3+}$  јона и водоник пероксида ( $\text{FeCl}_3:\text{H}_2\text{O}_2=1:25$ ) и излагањем биомасе плазми у трајању од 30 min уклоњено је 53,5% лигнина. Остварени резултати истакли су значај примене плазме као додатног извора водоник пероксида и других реактивних врста које учествују у Фентон реакцији. Континуалним увођењем водоник пероксида у реакциону смешу применом плазме остварен је 1,98 пута виши степен делигнификације у односу на Фентон третман без излагања плазми. Комбиновани плазма/Фентон третман је довео до повећања порозности биомасе, резултирајући повећањем приноса глукозе 2,25 пута у односу на сирову биомасу, чиме је потврђен допринос овог третмана искоришћењу биомасе у биотехнолошким процесима. Приликом фракционисања биомасе након третмана утврђено је да заостаје значајна количина гвожђа у лигнинској фракцији што отежава даљу валоризацију, па су разматране друге могућности унапређења третмана.

Највиши степен делигнификације од чак 86% остварен је применом комбинованог нетермална плазма/алкалног третмана. Употреба алкалног раствора водоник пероксида била је погодна за стварање хидропероксил јона који примарно доводи до делигнификације. Излагање

овог раствора плазми допринело је повећању концентрације хидропероксил јона. Третман је развијен тако да се изводи у краћим временским интервалима и на температурама нижим од уобичајених за алкалне третмане, што представља унапређење конвенционалних алкалних третмана и доприноси њиховој одрживости. Ефикасност третмана је потврђена не само у делигнификацији биомасе, већ и са аспекта добијања чистих фракција. Третирана биомаса је доминантно сачињена од целулозе, уређене кристалне структуре, која је потврђена применом SEM микрографије и рендгенске анализе. Захваљујући побољшаним морфолошким и структурним карактеристикама, овако добијена целулозом богата фракција се, уз мање модификације, може превести и у микроструктурну целулозу и као таква користити у фармацеутској или прехранбеној индустрији, или потенцијално и у биомедицини. Третирану биомасу карактерише висок степен конверзије током ензимске хидролизе, уз просечан принос шећера од 94% и при нижој концентрацији ензима од уобичајено коришћене у биотехнолошким поступцима. Ово је посебно значајно за искоришћење биомасе у ферментационим процесима. Примењени третман је довео до деполимеризације лигнина и његовог издвајања у виду честица микро и нано величине. Применом плазме добијене су честице правилног облика и униформне величине, при чему је спречена њихова агрегација, без додавања стабилизатора. Добијена лигнинска фракција светло браон боје је показала и антиоксидативну активност, те се може разматрати њена примена у козметичким и фармацеутским формулацијама. Такође, развијени поступак се показао као једнако ефикасан у третману сировина различитог хемијског састава. Остварени резултати истичу значај примене комбинованог плазма/алкалног третмана као јединственог поступка за истовремено добијање целулозне и лигнинске фракције високог квалитета. Укључивањем оваквог третмана у биорафинеријске поступке може се успоставити веза између биорафинерије на бази целулозе и биорафинерије на бази лигнина.

Третман кукурузне стабљике природним дубоким еутектичким смешама (NADES) потпомогнут плазмом је био други по ефикасности. Оптимизацијом третмана су утврђени процесни услови за постизање максималног степена делигнификације, при чему је чак 76% лигнина уклоњено током 30-минутног третмана. Степен делигнификације применом плазма/NADES третмана је био 1,3 пута већи од степена делигнификације оствареног када је за третман коришћена само еутектичка смеша, без плазме. Овиме је потврђен значај плазме као технике за постизање ефикаснијег уклањања лигнина, за шта се уобичајено користе ултразвук и микроталаси. Такође, по први пут је испитан утицај плазме на структуру саме смеше. FTIR спектроскопија је потврдила да излагањем смеше плазми долази до стварања нових водоничких веза, чиме се повећава стабилност смеше. Позитиван утицај плазме на смеше омогућио је ефикасно третирање биомасе при амбијенталним условима. Додатним испитивањима утврђено је да се слична ефикасност може постићи и при третманима краћим од 30 min, што значајно доприноси енергетској ефикасности процеса. Предложен је и нови приступ искоришћењу рекуперисане смеше након третмана, чиме је спречен губитак угљено-хидратне компоненте која се делимично разграђује применом киселих NADES. Рекуперисана смеша богата шећерима који потичу од разградње целулозе и хемицелулозе искоришћена је као супстрат за раст *L. rhamnosus*, чиме је показано да током третмана не долази до стварања инхибиторних једињења, која би неповољно утицала на раст микроорганизама. До сада није испитивана могућност извођења млечно-киселинске ферментације у NADES растварачима, док је висока виабилност бактерија од  $8,2 \pm 0,2 \log \text{CFU mL}^{-1}$  потврдила валидност предложене хипотезе. Ензимском хидролизом третиране биомасе потврђено је да делимична разградња угљено-хидратне компоненте, до које је дошло током третмана, није имала негативан утицај на принос шећера, који је у третираној биомаси износио око 50%. Након третмана је изолована и лигнинска фракција, погодних органолептичких својстава, која је након екстраховања у диметил-сулфоксиду показала антиоксидативну активност. Примењеним третманом добијене су три фракције – третирана биомаса доминантно сачињена од целулозе, лигнинска фракција и рекуперисана NADES богата шећерима. Искоришћењем све три фракције развијени третман приближава „zero waste“ и „zero pollution“ концептима, који представљају основна начела у

развоју биорафинеријских поступака. Такође, развијени поступци прате важне принципе безбедности и одрживости кроз дизајн (енгл. *Safety and Sustainability by Design (SSbD)*).

На основу претходно остварених резултата, узорци третирано комбинованим плазма/алкалним и плазма/NADES третманом су одабрани као најпогоднији за искоришћење у млечно-киселинској ферментацији, алкохолној ферментацији и анаеробној дигестији. Остварени приноси потврдили су могућност примене третиране биомасе, односно хидролизата третиране биомасе, као супстрата за производњу млечне киселине, биоетанола и биометана. Такође, потврђен је допринос примењених третмана у остваривању виших приноса у односу на сирову биомасу. Конкретно, примењени третмани су омогућили производњу 25% више млечне киселине у случају плазма/алкалног третмана и 48% више млечне киселине у случају плазма/NADES третмана. Хидролизати третиране биомасе поговали су расту производног микроорганизма, што је потврдио и висок просечан број живих ћелија *L. rhamnosus* 24 h након почетка ферментације ( $9,3 \pm 0,4 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ). Сличан ефекат третмана је уочен и након алкохолне ферментације, уз 1,2 пута више приносе биоетанола остварене ферментацијом хидролизата третиране биомасе у односу на сирову биомасу. У следећој фази истраживања требало би извршити оптимизацију услова за одвијање оба типа ферментације у циљу повећања приноса млечне киселине и биоетанола. Специфичан хемијски састав биомасе третиране плазма/алкалним и плазма/NADES третманом омогућио је ефикасну конверзију биомасе до биометана, уз значајне приносе остварене након 30 дана. Принос биометана насталог дигестијом узорка третираног плазма/алкалним третманом био је свега 7% нижи од приноса оствареног дигестијом чисте целулозе, док се биомаса третирана плазма/NADES третманом показала као погоднији супстрат од целулозе, уз остваривање нешто вишег приноса. Примењени третмани су допринели и смањењу техничког времена дигестије биомасе, те је 80% укупног биометана произведено за свега 5 дана након плазма/алкалног третмана, односно за 7 дана након плазма/NADES третмана. Када је за производњу биометана коришћена сирова биомаса, техничко време дигестије износило је 13 дана. Ово доводи до закључка да се енергетска ефикасност производње биометана може повећати укључивањем предложених третмана као неизоставног корак који би претходио анаеробној дигестији.

Оквирна процена одрживости третмана развијених у оквиру ове дисертације показала је да је комбиновани плазма/NADES третман захтевао најмањи утросак енергије, захваљујући најкраћој дужини третмана. Међутим, као најисплативији третман истакао се комбиновани плазма/алкални третман. Овај исход последица је висине трошкова који потичу од аргона потрошеног током третмана плазмом, као и трошкова употребљених реагенса. Иако су варијабилни трошкови плазма/NADES третмана виши, применом овог третмана омогућено је потпуно искоришћење свих фракција биомасе, уз воду и етанол као једине отпадне токове, који се и сами могу поново користити као раствори техничке чистоће. Такође, биокомпатибилност и биоразградивост еутектичких смеша, уз минималан утросак енергије, чине овај третман атрактивним за скалирање, што је испитано у оквиру дисертације у DBD плазма реактору са микромехурићима. Анаеробном дигестијом биомасе третиране еутектичком смешом у поменутом реактору произведена је енергија довољна за осам наредних циклуса третмана. Ово је важан допринос и изузетно унапређење у односу на конвенционални процес, и представља основ за свеобухватна испитивања са циљем примене на вишем технолошком нивоу.

Током испитивања у оквиру ове докторске дисертације показана је могућност употребе лигнинолитичког ензима манган пероксидазе за развијање новог поступка тзв. „*lignin first*“ биорафинерије. Наиме, резултати остварени након комбиновања плазме са манган пероксидазом указују на потенцијалну целулазну и хемицелулазну ефикасност оваквог система. Укључивањем одговарајућих ензима из групе целулаза у овај систем, потенцијално се може разградити угљено-хидратна компонента лигноцелулозе, при чему би заостала третирана биомаса била доминантно изграђена од лигнина. Испитивање синергизма плазма третмана и ензима је нов концепт уведен у оквиру ове дисертације и представља значајан допринос који може отворити нове правце истраживања у биорафинерији.

## 6. ЛИТЕРАТУРА

- [1] Kaza S, Yao LC, Bhada-Tata P, Van Woerden F. What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. Washington, DC: World Bank; 2018. <https://doi.org/10.1596/978-1-4648-1329-0>.
- [2] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Climate Change: Agrifood systems emissions / Emissions totals - Metadata. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/GT2024>.
- [3] United Nations. Kyoto Protocol to the United Nations Framework Convention on Climate Change. Geneva: 1997.
- [4] European Commission. The European Green Deal. [https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal\\_en](https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal_en).
- [5] United Nations. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. 2015.
- [6] Marinina O, Kirsanova N, Nevskaya M. Circular Economy Models in Industry: Developing a Conceptual Framework. *Energies (Basel)* 2022;15:9376. <https://doi.org/10.3390/en15249376>.
- [7] European Parliament & Council. Directive 2003/30/EC of the European Parliament and of the Council on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport. 2003.
- [8] Cherubini F, Jungmeier G, Wellisch M, Willke T, Skiadas I, Van Ree R, et al. Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2009;3:534–46. <https://doi.org/10.1002/bbb.172>.
- [9] Tursi A. A review on biomass: importance, chemistry, classification, and conversion. *Biofuel Research Journal* 2019;6:962–79. <https://doi.org/10.18331/BRJ2019.6.2.3>.
- [10] Sharma V, Tsai ML, Chen CW, Sun PP, Patel AK, Singhanian RR, et al. Deep eutectic solvents as promising pretreatment agents for sustainable lignocellulosic biorefineries: A review. *Bioresour Technol* 2022;360:127631. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127631>.
- [11] Capanoglu E, Nemli E, Tomas-Barberan F. Novel Approaches in the Valorization of Agricultural Wastes and Their Applications. *J Agric Food Chem* 2022;70:6787–804. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07104>.
- [12] Ravindran R, Sarangapani C, Jaiswal S, Lu P, Cullen PJ, Bourke P, et al. Improving enzymatic hydrolysis of brewer spent grain with nonthermal plasma. *Bioresour Technol* 2019;282:520–4. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.071>.
- [13] Shang K, Li J, Morent R. Hybrid electric discharge plasma technologies for water decontamination: a short review. *Plasma Science and Technology* 2019;21:043001. <https://doi.org/10.1088/2058-6272/aafbc6>.
- [14] Jungmeier G, Stichnothe H, de Bari I, Jørgensen H, Van Ree R, de Jong E. A biorefinery fact sheet for the sustainability assessment of energy driven biorefineries. Efforts of IEA Bioenergy Task 42 “biorefining”. Conference proceedings of the 21st European biomass conference, Copenhagen, Denmark: 2013.
- [15] Annevelink B, Garcia Chavez L, van Ree R, Gursel IV. Global biorefinery status report 2022. IEA Bioenergy: Task 42 Biorefining in a circular economy. 2022.
- [16] Kamm B, Kamm M, Gruber PR, Kromus S. *Biorefinery Systems – An Overview. Biorefineries-Industrial Processes and Products*, Wiley; 2005, p. 1–40. <https://doi.org/10.1002/9783527619849.ch1>.
- [17] Kamm B, Kamm M. Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64:137–45. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1537-7>.
- [18] Srirangan K, Akawi L, Moo-Young M, Chou CP. Towards sustainable production of clean energy carriers from biomass resources. *Appl Energy* 2012;100:172–86. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2012.05.012>.
- [19] Alalwan HA, Alminshid AH, Aljaafari HAS. Promising evolution of biofuel generations. Subject review. *Undefined* 2019;28:127–39. <https://doi.org/10.1016/J.REF.2018.12.006>.

- [20] Ginni G, Kavitha S, Yukesh Kannah R, Bhatia SK, Adish Kumar S, Rajkumar M, et al. Valorization of agricultural residues: Different biorefinery routes. *J Environ Chem Eng* 2021;9. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105435>.
- [21] Kaltschmitt M. Renewable Energy from Biomass, Introduction. *Renewable Energy Systems* 2013;1393–6. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5820-3\\_924](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5820-3_924).
- [22] Cheng YS, Mutrakulcharoen P, Chueter S, Cheenkachorn K, Tantayotai P, Panakkal EJ, et al. Recent Situation and Progress in Biorefining Process of Lignocellulosic Biomass: Toward Green Economy. *Applied Science and Engineering Progress* 2020;13. <https://doi.org/10.14416/j.asep.2020.08.002>.
- [23] Alizadeh H, Teymouri F, Gilbert TI, Dale BE. Pretreatment of Switchgrass by Ammonia Fiber Explosion (AFEX). *Appl Biochem Biotechnol* 2005;124:1133–42. <https://doi.org/10.1385/ABAB:124:1-3:1133>.
- [24] Garmendia Aguirre I, Abbate E, Bracalente G, Mancini L, Cappucci GM, et al. Safe and Sustainable by Design Chemicals and Materials. Revised framework (2025). Luxembourg: 2025.
- [25] Kumar B, Bhardwaj N, Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P. Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology* 2020;199. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>.
- [26] Fedorova E, Caló A, Pongrácz E. Balancing Socio-Efficiency and Resilience of Energy Provisioning on a Regional Level, Case Oulun Energia in Finland. *Clean Technologies* 2019;1:273–93. <https://doi.org/10.3390/cleantechnol1010019>.
- [27] Mujtaba M, Fernandes Fraceto L, Fazeli M, Mukherjee S, Savassa SM, Araujo de Medeiros G, et al. Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. *J Clean Prod* 2023;402:136815. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136815>.
- [28] Chen H. Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. *Biotechnology of Lignocellulose*, Dordrecht: Springer Netherlands; 2014, p. 25–71. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7_2).
- [29] Bonechi C, Consumi M, Donati A, Leone G, Magnani A, Tamasi G, et al. Biomass: An overview. In: Dalena F, Basile A, Rossi C, editors. *Bioenergy Systems for the Future: Prospects for Biofuels and Biohydrogen.*, 2017, p. 3–42.
- [30] Philippini RR, Martiniano SE, Ingle AP, Franco Marcelino PR, Silva GM, Barbosa FG, et al. Agroindustrial Byproducts for the Generation of Biobased Products: Alternatives for Sustainable Biorefineries. *Front Energy Res* 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.00152>.
- [31] Fengel D, Wegener G. Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions* 2011:1–618. <https://doi.org/10.1515/9783110839654/HTML>.
- [32] Jindal MK, Jha MK. Hydrothermal liquefaction of wood: a critical review. *Reviews in Chemical Engineering* 2016;32. <https://doi.org/10.1515/revce-2015-0055>.
- [33] Bajpai P. Xylanases. *Encyclopedia of Microbiology*, Elsevier; 2009, p. 600–12. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00165-6>.
- [34] Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin DB. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol Adv* 2011; 29: 675–85. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.05.005>.
- [35] Abdelaziz OY, Clemmensen I, Meier S, Costa CAE, Rodrigues AE, Hultberg CP, et al. On the Oxidative Valorization of Lignin to High-Value Chemicals: A Critical Review of Opportunities and Challenges. *ChemSusChem* 2022;15. <https://doi.org/10.1002/cssc.202201232>.
- [36] Sette M, Wechselberger R, Crestini C. Elucidation of Lignin Structure by Quantitative 2D NMR. *Chemistry – A European Journal* 2011;17:9529–35. <https://doi.org/10.1002/chem.201003045>.

- [37] Guadix-Montero S, Sankar M. Review on Catalytic Cleavage of C–C Inter-unit Linkages in Lignin Model Compounds: Towards Lignin Depolymerisation. *Top Catal* 2018;61:183–98. <https://doi.org/10.1007/s11244-018-0909-2>.
- [38] Chio C, Sain M, Qin W. Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2019;107:232–49. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.03.008>.
- [39] Bajpai P. *Biotechnology for Pulp and Paper Processing*. Singapore: Springer Singapore; 2018. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-7853-8>.
- [40] Kululo WW, Habtu NG, Abera MK, Sendekie ZB, Fanta SW, Yemata TA. Advances in various pretreatment strategies of lignocellulosic substrates for the production of bioethanol: a comprehensive review. *Discover Applied Sciences* 2025;7:476. <https://doi.org/10.1007/s42452-025-06748-1>.
- [41] Baruah J, Nath BK, Sharma R, Kumar S, Deka RC, Baruah DC, et al. Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. *Front Energy Res* 2018;6. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>.
- [42] Kaushik V, Kataria R. Non-conventional strategies for pretreatment of lignocellulosic biomass for production of value-added products: a sustainable and circular economy approach. *Biomass Convers Biorefin* 2025;15:14697–727. <https://doi.org/10.1007/s13399-024-06388-2>.
- [43] World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2025. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); 2025. <https://doi.org/10.4060/cd4313en>.
- [44] Statistički godišnjak Republike Srbije. Beograd: 2025.
- [45] Stevenson JC, Goodman MM. Ecology of Exotic Races of Maize. I. Leaf Number and Tillering of 16 Races Under Four Temperatures and Two Photoperiods. *Crop Sci* 1972;12:864–8. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI1972.0011183X001200060045X>.
- [46] Todorović J, Lazić B, Komljenović I, Nenadić N, Đurovska M, Janjić V. *Ratarsko-povrtarski priručnik*. Glifomark; 2003.
- [47] Ruan Z, Wang X, Liu Y, Liao W. Corn. *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*, Elsevier; 2019, p. 59–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814138-0.00003-4>.
- [48] Piper M, i sar. *Kukuruz*. Zadružna knjiga; 1965.
- [49] Kaur P, Singh J, Kaur M, Rasane P, Kaur S, Kaur J, et al. Corn Silk as an Agricultural Waste: A Comprehensive Review on Its Nutritional Composition and Bioactive Potential. *Waste Biomass Valorization* 2023;14:1413–32. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-02016-0>.
- [50] Lee CW, Seo JY, Kim SL, Lee J, Choi JW, Park YI. Corn silk maysin ameliorates obesity in vitro and in vivo via suppression of lipogenesis, differentiation, and function of adipocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017;93:267–75. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.039>.
- [51] Ho TY, Li CC, Lo HY, Chen FY, Hsiang CY. Corn Silk Extract and Its Bioactive Peptide Ameliorated Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Mice via the Nuclear Factor- $\kappa$ B Signaling Pathway. *J Agric Food Chem* 2017;65:759–68. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03327>.
- [52] Wang S, Xiao C, Xing Y, Xu H, Zhang S. Carbon nanofibers/nanosheets hybrid derived from cornstalks as a sustainable anode for Li-ion batteries. *J Mater Chem A Mater* 2015;3:6742–6. <https://doi.org/10.1039/C5TA00050E>.
- [53] Smith T, Chakanyuka C, Sibanda S, Manyuchi B. Maize stover as a feed for ruminants. In: Said AN, Dzowela B, editors. *Overcoming Constraints to the Efficient Utilization of Agricultural By-Products as Animal Feed*, Addis Ababa: ILCA; 1989, p. 218–31. <https://doi.org/10.1007/s11605-013-2363-6>.
- [54] Zhao X, Chen J, Chen F, Wang X, Zhu Q, Ao Q. Surface characterization of corn stalk superfine powder studied by FTIR and XRD. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;104:207–12. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.003>.

- [55] Yuan W, Gong Z, Wang G, Zhou W, Liu Y, Wang X, et al. Alkaline organosolv pretreatment of corn stover for enhancing the enzymatic digestibility. *Bioresour Technol* 2018;265:464–70. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.038>.
- [56] Akgül M, Güler C, Üner B. Opportunities in utilization of agricultural residues in bio-composite production: Corn stalk (*Zea mays indurata* Sturt) and oak wood (*Quercus Robur* L.) fiber in medium density fiberboard. *Afr J Biotechnol* 2002;9:5090–8.
- [57] Ye ZH. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2002;53:183–202. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135245>.
- [58] Šinžar B. Botanika. Beograd: Naučna knjiga; 1988.
- [59] Zhang J, Zhou H, Liu D, Zhao X. Pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification of cellulose. *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*, Elsevier; 2020, p. 17–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815936-1.00002-2>.
- [60] Mankar AR, Pandey A, Modak A, Pant KK. Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresour Technol* 2021;334:125235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125235>.
- [61] Njoku SI, Ahring BK, Uellendahl H. Pretreatment as the crucial step for a cellulosic ethanol biorefinery: Testing the efficiency of wet explosion on different types of biomass. *Bioresour Technol* 2012;124:105–10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.030>.
- [62] Bajpai P. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass 2016:17–70. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0687-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0687-6_4).
- [63] Chen H, Liu J, Chang X, Chen D, Xue Y, Liu P, et al. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology* 2017;160:196–206. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.12.007>.
- [64] Das N, Jena PK, Padhi D, Kumar Mohanty M, Sahoo G. A comprehensive review of characterization, pretreatment and its applications on different lignocellulosic biomass for bioethanol production. *Biomass Convers Biorefin* 2023;13:1503–27. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01294-3>.
- [65] Rajesh Banu J, Preethi, Kavitha S, Tyagi VK, Gunasekaran M, Karthikeyan OP, et al. Lignocellulosic biomass based biorefinery: A successful platform towards circular bioeconomy. *Fuel* 2021;302. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121086>.
- [66] Mikulski D, Kłosowski G. Microwave-assisted dilute acid pretreatment in bioethanol production from wheat and rye stillages. *Biomass Bioenergy* 2020;136:105528. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105528>.
- [67] Eskicioglu C, Terzian N, Kennedy K, Droste R, Hamoda M. Athermal microwave effects for enhancing digestibility of waste activated sludge. *Water Res* 2007;41:2457–66. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.008>.
- [68] Hassan SS, Williams GA, Jaiswal AK. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 2018;262:310–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.099>.
- [69] Luo J, Fang Z, Smith RL. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. *Prog Energy Combust Sci* 2014;41:56–93. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2013.11.001>.
- [70] Ivetić D, Omorjan RP, Đorđević TR, Antov MG. The impact of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of cellulose from sugar beet shreds: Modeling of the experimental results. *Environ Prog Sustain Energy* 2017;36:1164–72. <https://doi.org/10.1002/EP.12544>.
- [71] Lamsal B, Yoo J, Brijwani K, Alavi S. Extrusion as a thermo-mechanical pre-treatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass Bioenergy* 2010;34:1703–10. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2010.06.009>.
- [72] Shafizadeh F, Bradbury AGW. Thermal degradation of cellulose in air and nitrogen at low temperatures. *J Appl Polym Sci* 1979;23:1431–42. <https://doi.org/10.1002/APP.1979.070230513>.
- [73] Bridgwater AV. Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading. *Biomass Bioenergy* 2012;38:68–94. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.048>.

- [74] Hyun Hong S, Taek Lee J, Lee S, Gon Wi S, Ju Cho E, Singh S, et al. Improved enzymatic hydrolysis of wheat straw by combined use of gamma ray and dilute acid for bioethanol production. *Radiation Physics and Chemistry* 2014;94:231–5. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2013.05.056>.
- [75] Charlesby A. Crosslinking and degradation of polymers. *Radiation Physics and Chemistry* (1977) 1981;18:59–66. [https://doi.org/10.1016/0146-5724\(81\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0146-5724(81)90064-9).
- [76] Xiang Y, Xiang Y, Wang L. Electron beam irradiation to enhance enzymatic saccharification of alkali soaked *Artemisia ordosica* used for production of biofuels. *J Environ Chem Eng* 2017;5:4093–100. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.07.058>.
- [77] Bocker R, Silva EK. Pulsed electric field technology as a promising pre-treatment for enhancing orange agro-industrial waste biorefinery. *RSC Adv* 2024;14:2116–33. <https://doi.org/10.1039/D3RA07848E>.
- [78] Rooni V, Raud M, Kikas T. The freezing pre-treatment of lignocellulosic material: A cheap alternative for Nordic countries. *Energy* 2017;139:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.07.146>.
- [79] Lu Z, Xie T, Chen H, Li L, Li S, Lu Y, et al. Evaluation of effects of freezing pretreatment on the grindability, energy consumption and chemical composition of wheat straw. *Renew Energy* 2020;151:21–9. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.10.139>.
- [80] Antonopoulou G, Vayenas D, Lyberatos G. Ethanol and hydrogen production from sunflower straw: The effect of pretreatment on the whole slurry fermentation. *Biochem Eng J* 2016;116:65–74. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.014>.
- [81] Shahabazuddin Md, Sarat Chandra T, Meena S, Sukumaran RK, Shetty NP, Mudliar SN. Thermal assisted alkaline pretreatment of rice husk for enhanced biomass deconstruction and enzymatic saccharification: Physico-chemical and structural characterization. *Bioresour Technol* 2018;263:199–206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.027>.
- [82] Kamireddy SR, Li J, Tucker M, Degenstein J, Ji Y. Effects and Mechanism of Metal Chloride Salts on Pretreatment and Enzymatic Digestibility of Corn Stover. *Ind Eng Chem Res* 2013;52:1775–82. <https://doi.org/10.1021/ie3019609>.
- [83] Borand MN, Karaosmanoğlu F. Effects of organosolv pretreatment conditions for lignocellulosic biomass in biorefinery applications: A review. *Journal of Renewable and Sustainable Energy* 2018;10:033104. <https://doi.org/10.1063/1.5025876>.
- [84] Nargotra P, Sharma V, Sharma S, Bangotra R, Bajaj BK. Purification of an ionic liquid stable cellulase from *Aspergillus aculeatus* PN14 with potential for biomass refining. *Environmental Sustainability* 2022;5:313–23. <https://doi.org/10.1007/s42398-022-00232-x>.
- [85] Martins MAR, Pinho SP, Coutinho JAP. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. *J Solution Chem* 2019;48:962–82. <https://doi.org/10.1007/s10953-018-0793-1>.
- [86] Smith EL, Abbott AP, Ryder KS. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem Rev* 2014;114:11060–82. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.
- [87] El Achkar T, Greige-Gerges H, Fourmentin S. Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environ Chem Lett* 2021;19:3397–408. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01225-8>.
- [88] Sharma V, Tsai ML, Chen CW, Sun PP, Patel AK, Singhanian RR, et al. Deep eutectic solvents as promising pretreatment agents for sustainable lignocellulosic biorefineries: A review. *Bioresour Technol* 2022;360:127631. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127631>.
- [89] del Mar Contreras-Gómez M, Galán-Martín Á, Seixas N, da Costa Lopes AM, Silvestre A, Castro E. Deep eutectic solvents for improved biomass pretreatment: Current status and future prospective towards sustainable processes. *Bioresour Technol* 2023;369:128396. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128396>.
- [90] Prabhune A, Dey R. Green and sustainable solvents of the future: Deep eutectic solvents. *J Mol Liq* 2023;379:121676. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121676>.
- [91] Yiin CL, Yap KL, Ku AZE, Chin BLF, Lock SSM, Cheah KW, et al. Recent advances in green solvents for lignocellulosic biomass pretreatment: Potential of choline chloride (ChCl) based

- solvents. *Bioresour Technol* 2021;333:125195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125195>.
- [92] Okonkwo CE, Hussain SZ, Manzoor S, Naseer B, Taiwo AE, Ayyash M, et al. A comprehensive review on the use of deep eutectic solvents for biomass processing, and the synergistic coupling with physical technology and biological method. *Bioresour Technol Rep* 2023;23:101577. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101577>.
- [93] Ma Q, Ji Q, Chen L, Zhu Z, Tu S, Okonkwo CE, et al. Multimode ultrasound and ternary deep eutectic solvent sequential pretreatments enhanced the enzymatic saccharification of corncob biomass. *Ind Crops Prod* 2022;188:115574. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115574>.
- [94] Wang Y, Liu H, Ji X, Wang Q, Tian Z, Fatehi P. Production of nanocellulose using acidic deep eutectic solvents based on choline chloride and carboxylic acids: A review. *Int J Biol Macromol* 2023;245:125227. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125227>.
- [95] Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain Chem Eng* 2014;2:1063–71. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>.
- [96] Lundquist K, Ericsson L, Schroll G, Lindberg AA, Lagerlund I, Ehrenberg L. Acid Degradation of Lignin. VI. Formation of Methanol. *Acta Chem Scand* 1971;25:756–8. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.25-0756>.
- [97] Rahimi A, Ulbrich A, Coon JJ, Stahl SS. Formic-acid-induced depolymerization of oxidized lignin to aromatics. *Nature* 2014;515:249–52. <https://doi.org/10.1038/nature13867>.
- [98] Li P, Zhang Z, Zhang X, Li K, Jin Y, Wu W. DES: their effect on lignin and recycling performance. *RSC Adv* 2023;13:3241–54. <https://doi.org/10.1039/D2RA06033G>.
- [99] Zhou M, Tian X. Development of different pretreatments and related technologies for efficient biomass conversion of lignocellulose. *Int J Biol Macromol* 2022;202:256–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.036>.
- [100] Chen Z, Wan C. Ultrafast fractionation of lignocellulosic biomass by microwave-assisted deep eutectic solvent pretreatment. *Bioresour Technol* 2018;250:532–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.066>.
- [101] Gan P, Zhang K, Xu Q, Zhao Y, Li J, Yang G, et al. Microwave-assisted choline chloride/lactic acid pretreatment for high-efficiency separation and value-added utilization of Sugarcane bagasse components. *Ind Crops Prod* 2024;220:119251. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119251>.
- [102] Lee KM, Hong JY, Tey WY. Combination of ultrasonication and deep eutectic solvent in pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced enzymatic saccharification. *Cellulose* 2021;28:1513–26. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03598-5>.
- [103] Lobato-Rodríguez Á, Gullón B, Romani A, Ferreira-Santos P, Garrote G, Del-Río PG. Recent advances in biorefineries based on lignin extraction using deep eutectic solvents: A review. *Bioresour Technol* 2023;388:129744. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129744>.
- [104] Li HQ, Jiang W, Jia JX, Xu J. pH pre-corrected liquid hot water pretreatment on corn stover with high hemicellulose recovery and low inhibitors formation. *Bioresour Technol* 2014;153:292–9. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.11.089>.
- [105] Chen HZ, Liu ZH. Steam explosion and its combinatorial pretreatment refining technology of plant biomass to bio-based products. *Biotechnol J* 2015;10:866–85. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201400705>.
- [106] Singh J, Suhag M, Dhaka A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. *Carbohydr Polym* 2015;117:624–31. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.10.012>.
- [107] Kim D. Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review. *Molecules* 2018;23:309. <https://doi.org/10.3390/molecules23020309>.

- [108] Carrasco C, Baudel HM, Sendelius J, Modig T, Roslander C, Galbe M, et al. SO<sub>2</sub>-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. *Enzyme Microb Technol* 2010;46:64–73. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.016>.
- [109] McGinnis GD, Wilson WW, Prince SE, Chen CC. Conversion of biomass into chemicals with high-temperature wet oxidation. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* 1983;22:633–6. <https://doi.org/10.1021/i300012a022>.
- [110] Bjerre AB, Olesen AB, Fernqvist T, Plöger A, Schmidt AS. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnol Bioeng* 1996;49:568–77.
- [111] Rodríguez-Peña M, Barrios Pérez JA, Llanos J, Sáez C, Rodrigo MA, Barrera-Díaz CE. New insights about the electrochemical production of ozone. *Curr Opin Electrochem* 2021;27:100697. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100697>.
- [112] Maurya DP, Singla A, Negi S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech* 2015;5:597–609. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0279-4>.
- [113] Sun X, Zhao X, Du W, Liu D. Kinetics of Formic Acid-autocatalyzed Preparation of Performic Acid in Aqueous Phase. *Chin J Chem Eng* 2011;19:964–71. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(11\)60078-5](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60078-5).
- [114] Wan C, Li Y. Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresour Technol* 2010;101:6398–403. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.070>.
- [115] Zabed HM, Akter S, Yun J, Zhang G, Awad FN, Qi X, et al. Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2019;105:105–28. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.048>.
- [116] Broda M, Yelle DJ, Serwańska K. Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass—Challenges and Solutions. *Molecules* 2022;27:8717. <https://doi.org/10.3390/molecules27248717>.
- [117] Shi Y, Yan X, Li Q, Wang X, Liu M, Xie S, et al. Directed bioconversion of Kraft lignin to polyhydroxyalkanoate by *Cupriavidus basilensis* B-8 without any pretreatment. *Process Biochemistry* 2017;52:238–42. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.10.004>.
- [118] Sánchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* 2009;27:185–94. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>.
- [119] Jeffries TW. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In: Ratledge C, editor. *Biochemistry of microbial degradation*, Dordrecht Kluwer; 1994, p. 233–77.
- [120] Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresour Bioprocess* 2018;5:4. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0190-z>.
- [121] Weng C, Peng X, Han Y. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. *Biotechnol Biofuels* 2021;14:84. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01934-w>.
- [122] Cagide C, Castro-Sowinski S. Technological and biochemical features of lignin-degrading enzymes: a brief review. *Environmental Sustainability* 2020;3:371–89. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00140-y>.
- [123] Nargotra P, Sharma V, Lee YC, Tsai YH, Liu YC, Shieh CJ, et al. Microbial Lignocellulolytic Enzymes for the Effective Valorization of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Catalysts* 2022;13:83. <https://doi.org/10.3390/catal13010083>.
- [124] Singh RL, Singh PK, Singh RP. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes – A review. *Int Biodeterior Biodegradation* 2015;104:21–31. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.027>.
- [125] Rahmanpour R, Rea D, Jamshidi S, Fülöp V, Bugg TDH. Structure of *Thermobifida fusca* DyP-type peroxidase and activity towards Kraft lignin and lignin model compounds. *Arch Biochem Biophys* 2016;594:54–60. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.019>.

- [126] Garcia-Ruiz E, Mate DM, Gonzales-Perez D, et al. Directed evolution of ligninolytic oxidoreductases: from functional expression to stabilization and beyond. In: Fessner W, editor. *Cascade Biocatalysis*, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2014, p. 1–22.
- [127] Pérez-Boada M, Ruiz-Dueñas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T, Martínez MJ, et al. Versatile Peroxidase Oxidation of High Redox Potential Aromatic Compounds: Site-directed Mutagenesis, Spectroscopic and Crystallographic Investigation of Three Long-range Electron Transfer Pathways. *J Mol Biol* 2005;354:385–402. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.047>.
- [128] Glenn JK, Gold MH. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 1985;242:329–41. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90217-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90217-6).
- [129] Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev* 1994;13:125–35. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00039.x>.
- [130] Sundaramoorthy M, Gold MH, Poulos TL. Ultrahigh (0.93Å) resolution structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: Implications for the catalytic mechanism. *J Inorg Biochem* 2010;104:683–90. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.02.011>.
- [131] Perez J, Jeffries TW. Mineralization of <sup>14</sup>C-Ring-Labeled Synthetic Lignin Correlates with the Production of Lignin Peroxidase, not of Manganese Peroxidase or Laccase. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:1806–12. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1806-1812.1990>.
- [132] Sundaramoorthy M, Kishi K, Gold MH, Poulos TL. Crystal Structures of Substrate Binding Site Mutants of Manganese Peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:17574–80. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17574>.
- [133] Kumar A, Chandra R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon* 2020;6:e03170. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>.
- [134] Singh D, Zeng J, Chen S. Increasing manganese peroxidase productivity of *Phanerochaete chrysosporium* by optimizing carbon sources and supplementing small molecules. *Lett Appl Microbiol* 2011;53:120–3. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03070.x>.
- [135] Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb Technol* 2002;30:454–66. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00528-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00528-2).
- [136] Saikia S, Yadav M, Hoque RA, Yadav HS. Bioremediation mediated by manganese peroxidase – An overview. *Biocatal Biotransformation* 2023;41:161–73. <https://doi.org/10.1080/10242422.2022.2113517>.
- [137] Wariishi H, Akileswaran L, Gold MH. Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry* 1988;27:5365–70. <https://doi.org/10.1021/bi00414a061>.
- [138] Brown ME, Chang MCY. Exploring bacterial lignin degradation. *Curr Opin Chem Biol* 2014;19:1–7. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2013.11.015>.
- [139] Paul M, Pandey NK, Banerjee A, Shrotri GK, Tomer P, Gazara RK, et al. An insight into omics analysis and metabolic pathway engineering of lignin-degrading enzymes for enhanced lignin valorization. *Bioresour Technol* 2023;379:129045. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129045>.
- [140] Di Fraia A, Di Fraia S, V GS, Banu J R, Massarotti N. Role of advanced oxidation processes in lignocellulose pretreatment towards biorefinery applications: a review on emerging trends and economic considerations. *Green Chemistry* 2024;26:8461–96. <https://doi.org/10.1039/D3GC05108K>.
- [141] Toghiani J, Malekzadeh S, Jamali N, Afsham N, Fallah N, Mahboubi A, et al. Novel Advanced Oxidation Processes (AOPs) as Lignocellulosic Biomass Pretreatment Approaches and Their Sustainability Assessment: A Review. *Curr Pollut Rep* 2024;10:207–46. <https://doi.org/10.1007/s40726-024-00295-w>.

- [142] Wu D, Wei Z, Zhao Y, Zhao X, Mohamed TA, Zhu L, et al. Improved lignocellulose degradation efficiency based on Fenton pretreatment during rice straw composting. *Bioresour Technol* 2019;294:122132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122132>.
- [143] Gan Y-Y, Zhou S-L, Dai X, Wu H, Xiong Z-Y, Qin Y-H, et al. Effect of iron salt type and dosing mode on Fenton-based pretreatment of rice straw for enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol* 2018;265:394–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.043>.
- [144] Popović A, Milićević S, Milošević V, Ivošević B, Čarapić J, Jovanović V, et al. Fenton process in dispersed systems for industrial wastewater treatment. *Hem Ind* 2019;73:47–62. <https://doi.org/10.2298/HEMIND181019005P>.
- [145] Lipczynska-Kochany E. Degradation of aqueous nitrophenols and nitrobenzene by means of the Fenton reaction. *Chemosphere* 1991;22:529–36. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(91\)90064-K](https://doi.org/10.1016/0045-6535(91)90064-K).
- [146] Pliego G, Zazo JA, Garcia-Muñoz P, Munoz M, Casas JA, Rodriguez JJ. Trends in the Intensification of the Fenton Process for Wastewater Treatment: An Overview. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2015;45:2611–92. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1025646>.
- [147] Gomes A, Borges A, Peres JA, Lucas MS. Bioenergy Production from Agro-Industrial Wastewater Using Advanced Oxidation Processes as Pre-Treatment. *Catalysts* 2023;13:1186. <https://doi.org/10.3390/catal13081186>.
- [148] Den W, Sharma VK, Lee M, Nadadur G, Varma RS. Lignocellulosic Biomass Transformations via Greener Oxidative Pretreatment Processes: Access to Energy and Value-Added Chemicals. *Front Chem* 2018;6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00141>.
- [149] Moradi Z, Jahromi SZ, Ghaedi M. Design of active photocatalysts and visible light photocatalysis. *Interface Science and Technology*, vol. 32, 2021, p. 557–623. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818806-4.00012-7>.
- [150] Song Q, Wang F, Cai J, Wang Y, Zhang J, Yu W, et al. Lignin depolymerization (LDP) in alcohol over nickel-based catalysts via a fragmentation–hydrogenolysis process. *Energy Environ Sci* 2013;6:994. <https://doi.org/10.1039/c2ee23741e>.
- [151] Correia JAC, Júnior JEM, Gonçalves LRB, Rocha MVP. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. *Bioresour Technol* 2013;139:249–56. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.153>.
- [152] Zhan Y, Liu X, Huang C, Zhou X, Lyu Y, Lin Y, et al. Investigation of the alkaline hydrogen peroxide pretreatment: From cellulose saccharification to lignin isolation. *Ind Crops Prod* 2024;214:118533. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118533>.
- [153] Dutra ED, Santos FA, Alencar BRA, Reis ALS, de Souza RFR, Aquino KAS, et al. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of lignocellulosic biomass: status and perspectives. *Biomass Convers Biorefin* 2018;8:225–34. <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0277-3>.
- [154] Zhao C, Shao Q, Ma Z, Li B, Zhao X. Physical and chemical characterizations of corn stalk resulting from hydrogen peroxide presoaking prior to ammonia fiber expansion pretreatment. *Ind Crops Prod* 2016;83:86–93. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.018>.
- [155] Geng X, Henderson WA. Pretreatment of corn stover by combining ionic liquid dissolution with alkali extraction. *Biotechnol Bioeng* 2012;109:84–91. <https://doi.org/10.1002/bit.23281>.
- [156] Song W, Jiang J, Jiang H, Liu C, Dong Y, Chen X, et al. Acid/alkali-catalyzed deep eutectic solvent pretreatment of corn straw for enhanced biohydrogen production. *Fuel* 2023;348:128521. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.128521>.
- [157] Zhang D, Liu J, Xu H, Liu H, He YC. Improving saccharification efficiency of corn stover through ferric chloride-deep eutectic solvent pretreatment. *Bioresour Technol* 2024;399:130579. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130579>.
- [158] Yan D, Ji Q, Yu X, Li M, Abiola Fakayode O, Yagoub AEA, et al. Multimode-ultrasound and microwave assisted natural ternary deep eutectic solvent sequential pretreatments for corn straw biomass deconstruction under mild conditions. *Ultrason Sonochem* 2021;72:105414. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105414>.

- [159] Chen H, Li X, Yu S, Qin Y, Qu Y, Zhao J. Potassium permanganate assisted organosolv pretreatment enhances enzymatic hydrolysis of corn stover. *GCB Bioenergy* 2021;13:665–78. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12806>.
- [160] Zhang N, Tian C, Fu P, Yuan Q, Zhang Y, Li Z, et al. The Fractionation of Corn Stalk Components by Hydrothermal Treatment Followed by Ultrasonic Ethanol Extraction. *Energies (Basel)* 2022;15:2616. <https://doi.org/10.3390/en15072616>.
- [161] Banerjee S, Dey S, Anusha A, Bandyopadhyay TK, Banerjee R. Ultrasound-enhanced laccase pretreatment of corn stalks for sustainable biofuel production. *Biomass Bioenergy* 2025;202:108157. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2025.108157>.
- [162] Fridman A. Introduction to Theoretical and Applied Plasma Chemistry. *Plasma Chemistry* 2008;1–11. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511546075.003>.
- [163] Lieberman MA, Lichtenberg AJ. Principles of Plasma Discharges and Materials Processing. Wiley; 2005. <https://doi.org/10.1002/0471724254>.
- [164] Qin L, Li OL. Recent progress of low-temperature plasma technology in biorefining process. *Nano Converg* 2023;10:38. <https://doi.org/10.1186/s40580-023-00386-2>.
- [165] Chen C, Ma C, Yang Y, Yang X, Demeestere K, Nikiforov A, et al. Degradation of micropollutants in secondary wastewater effluent using nonthermal plasma-based AOPs: The roles of free radicals and molecular oxidants. *Water Res* 2023;235:119881. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119881>.
- [166] Golkowski M, Golkowski C, Leszczynski J, Plimpton SR, Maslowski P, Foltynowicz A, et al. Hydrogen-peroxide-enhanced nonthermal plasma effluent for biomedical applications. *IEEE Transactions on Plasma Science* 2012;40:1984–91. <https://doi.org/10.1109/TPS.2012.2200910>.
- [167] Abolore RS, Jaiswal S, Jaiswal AK. A comprehensive review of the application of cold plasma technology in lignocellulosic biomass pretreatment. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2025;19:453–68. <https://doi.org/10.1002/bbb.2706>.
- [168] Shao S, Ye Z, Sun J, Liu Ch, Yan J, Liu T, et al. A review on the application of non-thermal plasma (NTP) in the conversion of biomass: Catalyst preparation, thermal utilization and catalyst regeneration. *Fuel* 2022;330:125420. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125420>.
- [169] Gilbert Carlsson CM, Ström G. Reduction and Oxidation of Cellulose Surfaces by Means of Cold Plasma. *Langmuir* 1991;7:2492–7. [https://doi.org/10.1021/LA00059A016/ASSET/LA00059A016.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/LA00059A016/ASSET/LA00059A016.FP.PNG_V03).
- [170] Dimitrakellis P, Delikonstantis E, D. Stefanidis G, G. Vlachos D. Plasma technology for lignocellulosic biomass conversion toward an electrified biorefinery. *Green Chemistry* 2022;24:2680–721. <https://doi.org/10.1039/D1GC03436G>.
- [171] Zargarchi S, Hornbacher J, Afifi SM, Saremnezhad S, Günal-Köroğlu D, Capanoglu E, et al. Exploring the impact of cold plasma treatment on the antioxidant capacity, ascorbic acid, phenolic profile, and bioaccessibility of fruits and fruit juices. *Food Front* 2024;5:1108–25. <https://doi.org/10.1002/fft2.372>.
- [172] Shao T, Zhang C, Wang R, Zhou Y, Xie Q, Fang Z. Comparison of Atmospheric-Pressure He and Ar Plasma Jets Driven by Microsecond Pulses. *IEEE Transactions on Plasma Science* 2015;43:726–32. <https://doi.org/10.1109/TPS.2014.2359515>.
- [173] Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied Plasma Medicine. *Plasma Processes and Polymers* 2008;5:503–33. <https://doi.org/10.1002/ppap.200700154>.
- [174] Gupta TT, Ayan H. Application of Non-Thermal Plasma on Biofilm: A Review. *Applied Sciences* 2019;9:3548. <https://doi.org/10.3390/app9173548>.
- [175] Fridman G, Peddinghaus M, Ayan H, Fridman A, Balasubramanian M, Gutsol A, et al. Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 2006 26:4 2006;26:425–42. <https://doi.org/10.1007/S11090-006-9024-4>.

- [176] Morent R, De Geyter N, Verschuren J, De Clerck K, Kiekens P, Leys C. Non-thermal plasma treatment of textiles. *Surf Coat Technol* 2008;202:3427–49. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2007.12.027>.
- [177] Kaushik NK, Ghimire B, Li Y, Adhikari M, Veerana M, Kaushik N, et al. Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. *Biol Chem* 2018;400:39–62. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0226>.
- [178] Braginskiy OV, Vasilieva AN, Klopovskiy KS, Kovalev AS, Lopaev DV, Proshina OV, et al. Singlet oxygen generation in O<sub>2</sub> flow excited by RF discharge: I. Homogeneous discharge mode:  $\alpha$ -mode. *J Phys D Appl Phys* 2005;38:3609–25. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/38/19/010>.
- [179] Kurake N, Tanaka H, Ishikawa K, Takeda K, Hashizume H, Nakamura K, et al. Effects of •OH and •NO radicals in the aqueous phase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub>- generated in plasma-activated medium. *J Phys D Appl Phys* 2017;50:155202. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa5f1d>.
- [180] Uhm HS. Generation of various radicals in nitrogen plasma and their behavior in media. *Phys Plasmas* 2015;22. <https://doi.org/10.1063/1.4936796>.
- [181] Lukes P, Dolezalova E, Sisrova I, Clupek M. Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxyxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HNO<sub>2</sub>. *Plasma Sources Sci Technol* 2014;23:015019. <https://doi.org/10.1088/0963-0252/23/1/015019>.
- [182] Gao Y, Francis K, Zhang X. Review on formation of cold plasma activated water (PAW) and the applications in food and agriculture. *Food Research International* 2022;157:111246. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111246>.
- [183] Rubio CP, Cerón JJ. Spectrophotometric assays for evaluation of Reactive Oxygen Species (ROS) in serum: general concepts and applications in dogs and humans. *BMC Veterinary Research* 2021 17:1 2021;17:1–13. <https://doi.org/10.1186/S12917-021-02924-8>.
- [184] Anderson CE, Cha NR, Lindsay AD, Clark DS, Graves DB. The Role of Interfacial Reactions in Determining Plasma–Liquid Chemistry. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 2016;36:1393–415. <https://doi.org/10.1007/s11090-016-9742-1>.
- [185] Zhao YM, Patange A, Sun DW, Tiwari B. Plasma-activated water: Physicochemical properties, microbial inactivation mechanisms, factors influencing antimicrobial effectiveness, and applications in the food industry. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2020;19:3951–79. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12644>.
- [186] Lu P, Boehm D, Bourke P, Cullen PJ. Achieving reactive species specificity within plasma-activated water through selective generation using air spark and glow discharges. *Plasma Processes and Polymers* 2017;14. <https://doi.org/10.1002/ppap.201600207>.
- [187] Lukes P, Brisset JL, Locke BR. Biological Effects of Electrical Discharge Plasma in Water and in Gas-Liquid Environments. *Plasma Chemistry and Catalysis in Gases and Liquids* 2012:309–52. <https://doi.org/10.1002/9783527649525.CH8>.
- [188] Joshi I, Salvi D, Schaffner DW, Karwe MV. Characterization of Microbial Inactivation Using Plasma-Activated Water and Plasma-Activated Acidified Buffer. *J Food Prot* 2018;81:1472–80. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-487>.
- [189] Zheng Y, Wu S, Dang J, Wang S, Liu Z, Fang J, et al. Reduction of phoxim pesticide residues from grapes by atmospheric pressure non-thermal air plasma activated water. *J Hazard Mater* 2019;377:98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.05.058>.
- [190] del Río LA. ROS and RNS in plant physiology: an overview. *J Exp Bot* 2015;66:2827–37. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv099>.
- [191] Subramanian PSG, Jain A, Shivapuji AM, Sundaresan NR, Dasappa S, Rao L. Plasma-activated water from a dielectric barrier discharge plasma source for the selective treatment of cancer cells. *Plasma Processes and Polymers* 2020;17. <https://doi.org/10.1002/ppap.201900260>.

- [192] Krishna S, Ceriani E, Marotta E, Giardina A, Špatenka P, Paradisi C. Products and mechanism of verapamil removal in water by air non-thermal plasma treatment. *Chemical Engineering Journal* 2016;292:35–41. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.01.108>.
- [193] Mitrović T, Tomić N, Djukić-Vuković A, Dohčević-Mitrović Z, Lazović S. Atmospheric Plasma Supported by TiO<sub>2</sub> Catalyst for Decolourisation of Reactive Orange 16 Dye in Water. *Waste Biomass Valorization* 2020;11:6841–54. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00928-y>.
- [194] Spyrou N, Amorim J. Atmospheric Pressure DBD Low-Temperature Plasma Reactor for the Treatment of Sugarcane Bagasse. *IEEE Transactions on Plasma Science* 2019;47:1583–92. <https://doi.org/10.1109/TPS.2019.2897075>.
- [195] Cao Y, Tang M, Yang P, Chen M, Wang S, Hua H, et al. Atmospheric Low-Temperature Plasma-Induced Changes in the Structure of the Lignin Macromolecule: An Experimental and Theoretical Investigation. *J Agric Food Chem* 2020;68:451–60. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05604>.
- [196] Bundaleska N, Tatarova E, Dias FM, Lino da Silva M, Ferreira CM, Amorim J. Air–water ‘tornado’-type microwave plasmas applied for sugarcane biomass treatment. *J Phys D Appl Phys* 2014;47:055201. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/47/5/055201>.
- [197] Cao Y, Hua H, Yang P, Chen M, Chen W, Wang S, et al. Investigation into the reaction mechanism underlying the atmospheric low-temperature plasma-induced oxidation of cellulose. *Carbohydr Polym* 2020;233:115632. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115632>.
- [198] Travaini R, Barrado E, Bolado-Rodríguez S. Effect of ozonolysis pretreatment parameters on the sugar release, ozone consumption and ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 2016;214:150–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.102>.
- [199] Schultz-Jensen N, Kádár Z, Thomsen AB, Bindslev H, Leipold F. Plasma-Assisted Pretreatment of Wheat Straw for Ethanol Production. *Appl Biochem Biotechnol* 2011;165:1010–23. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9316-x>.
- [200] Shaghaleh H, Xu X, Liu H, Wang S, Alhaj Hamoud Y, Dong F, et al. The effect of atmospheric pressure plasma pretreatment with various gases on the structural characteristics and chemical composition of wheat straw and applications to enzymatic hydrolysis. *Energy* 2019;176:195–210. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.03.182>.
- [201] Pereira GN, Cesca K, Cubas ALV, Bianchet RT, Junior SEB, Zanella E, et al. Non-thermal plasma as an innovative pretreatment technology in delignification of brewery by-product. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2021;74:102827. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102827>.
- [202] Gao Y, Uner NB, Thimsen E, Foston MB. Accessing unconventional biofuels via reactions far from local equilibrium. *Fuel* 2018;226:472–8. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.03.188>.
- [203] Miranda FS, Rabelo SC, Pradella JGC, Carli CD, Petraconi G, Maciel HS, et al. Plasma in-Liquid Using Non-contact Electrodes: A Method of Pretreatment to Enhance the Enzymatic Hydrolysis of Biomass. *Waste Biomass Valorization* 2020;11:4921–31. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00824-5>.
- [204] Rahmati S, Atanda L, Deshan ADK, Moghaddam L, Dubal D, Doherty W, et al. A green process for producing xylooligosaccharides via autohydrolysis of plasma-treated sugarcane bagasse. *Ind Crops Prod* 2023;198:116690. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116690>.
- [205] Wright A, Bandulasena H, Ibenegbu C, Leak D, Holmes T, Zimmerman W, et al. Dielectric barrier discharge plasma microbubble reactor for pretreatment of lignocellulosic biomass. *AIChE Journal* 2018;64:3803–16. <https://doi.org/10.1002/aic.16212>.
- [206] Ravindran R, Sarangapani C, Jaiswal S, Cullen PJ, Jaiswal AK. Ferric chloride assisted plasma pretreatment of lignocellulose. *Bioresour Technol* 2017;243:327–34. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.123>.
- [207] Song CL, Zhang ZT, Chen WY, Liu C. Converting Cornstalk Into Simple Sugars With High-Pressure Nonequilibrium Plasma. *IEEE Transactions on Plasma Science* 2009;37:1817–24. <https://doi.org/10.1109/TPS.2009.2025950>.

- [208] Pereira GN, Cesca K, Pereira MAF, Monteiro Rudke CR, Borges OMA, Cubas ALV, et al. Non-thermal plasma as an efficient pretreatment to lignocellulosic raw materials. *J Food Process Eng* 2023;46. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14233>.
- [209] Mei D, Liu S, Wang S, Zhou R, Zhou R, Fang Z, et al. Plasma-enabled liquefaction of lignocellulosic biomass: Balancing feedstock content for maximum energy yield. *Renew Energy* 2020;157:1061–71. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.069>.
- [210] Karthikeyan PK, Grbic J, Iza F, Bandulasena HCH, Radu T. Microbubble Plasma-Assisted Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biogas Generation. *Waste Biomass Valorization* 2025;16:3987–4008. <https://doi.org/10.1007/s12649-025-03015-7>.
- [211] Bittencourt GA, Barreto ES, Brandão RL, Baêta BEL, Gurgel LVA. Fractionation of sugarcane bagasse using hydrothermal and advanced oxidative pretreatments for bioethanol and biogas production in lignocellulose biorefineries. *Bioresour Technol* 2019;292:121963. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121963>.
- [212] Asadi N, Zilouei H. Optimization of organosolv pretreatment of rice straw for enhanced biohydrogen production using *Enterobacter aerogenes*. *Bioresour Technol* 2017;227:335–44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.073>.
- [213] Udeh B. Bio-waste Transesterification Alternative for Biodiesel Production: A Combined Manipulation of Lipase Enzyme Action and Lignocellulosic Fermented Ethanol. *Asian J Biotechnol Bioresour Technol* 2018;3:1–9. <https://doi.org/10.9734/AJB2T/2018/40789>.
- [214] Nitsos C, Matsakas L, Triantafyllidis K, Rova U, Christakopoulos P. Evaluation of Mediterranean Agricultural Residues as a Potential Feedstock for the Production of Biogas via Anaerobic Fermentation. *Biomed Res Int* 2015;2015:1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/171635>.
- [215] Lin C, Wang Q, Deng Q, Huang H, Huang F, Huang L, et al. Preparation of highly hazy transparent cellulose film from dissolving pulp. *Cellulose* 2019;26:4061–9. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02367-3>.
- [216] Gürbüz EI, Gallo JMR, Alonso DM, Wettstein SG, Lim WY, Dumesic J. Conversion of Hemicellulose into Furfural Using Solid Acid Catalysts in  $\gamma$ -Valerolactone. *Angewandte Chemie International Edition* 2013;52:1270–4. <https://doi.org/10.1002/anie.201207334>.
- [217] Kohli K, Prajapati R, Sharma BK. Bio-Based Chemicals from Renewable Biomass for Integrated Biorefineries. *Energies (Basel)* 2019;12:233. <https://doi.org/10.3390/en12020233>.
- [218] Zhu F, Du B, Xu B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocoll* 2016;52:275–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.003>.
- [219] Du B, Meenu M, Liu H, Xu B. A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of  $\beta$ -Glucan. *Int J Mol Sci* 2019;20:4032. <https://doi.org/10.3390/ijms20164032>.
- [220] Kittisuban P, Ritthiruangdej P, Suphantharika M. Optimization of hydroxypropylmethylcellulose, yeast  $\beta$ -glucan, and whey protein levels based on physical properties of gluten-free rice bread using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology* 2014;57:738–48. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.045>.
- [221] de Wild PJ, Huijgen WJJ, Heeres HJ. Pyrolysis of wheat straw-derived organosolv lignin. *J Anal Appl Pyrolysis* 2012;93:95–103. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2011.10.002>.
- [222] Zhang X, Lei H, Zhu L, Qian M, Zhu X, Wu J, et al. Enhancement of jet fuel range alkanes from co-feeding of lignocellulosic biomass with plastics via tandem catalytic conversions. *Appl Energy* 2016;173:418–30. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.04.071>.
- [223] Guo T, Li X, Liu X, Guo Y, Wang Y. Catalytic Transformation of Lignocellulosic Biomass into Arenes, 5-Hydroxymethylfurfural, and Furfural. *ChemSusChem* 2018;11:2758–65. <https://doi.org/10.1002/cssc.201800967>.
- [224] Domínguez-Robles J, Cárcamo-Martínez Á, Stewart SA, Donnelly RF, Larrañeta E, Borrega M. Lignin for pharmaceutical and biomedical applications – Could this become a reality? *Sustain Chem Pharm* 2020;18. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100320>.

- [225] Xu J, Xu JJ, Lin Q, Jiang L, Zhang D, Li Z, et al. Lignin-Incorporated Nanogel Serving As an Antioxidant Biomaterial for Wound Healing. *ACS Appl Bio Mater* 2021;4:3–13. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00858>.
- [226] Wang H, Fu F, Huang M, Feng Y, Han D, Xi Y, et al. Lignin-based materials for electrochemical energy storage devices. *Nano Materials Science* 2023;5:141–60. <https://doi.org/10.1016/j.nanoms.2022.01.002>.
- [227] Varanasi P, Singh P, Auer M, Adams PD, Simmons BA, Singh S. Survey of renewable chemicals produced from lignocellulosic biomass during ionic liquid pretreatment. *Biotechnol Biofuels* 2013;6:14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-14>.
- [228] D'Arrigo P, Rossato LAM, Strini A, Serra S. From Waste to Value: Recent Insights into Producing Vanillin from Lignin. *Molecules* 2024;29:442. <https://doi.org/10.3390/molecules29020442>.
- [229] John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;74:524–34. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0779-6>.
- [230] Castillo Martinez FA, Balciunas EM, Salgado JM, Domínguez González JM, Converti A, Oliveira RPS. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci Technol* 2013;30:70–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007>.
- [231] Balla E, Daniilidis V, Karlioti G, Kalamas T, Stefanidou M, Bikiaris ND, et al. Poly(lactic Acid): A Versatile Biobased Polymer for the Future with Multifunctional Properties—From Monomer Synthesis, Polymerization Techniques and Molecular Weight Increase to PLA Applications. *Polymers (Basel)* 2021;13:1822. <https://doi.org/10.3390/polym13111822>.
- [232] Chauhan S, Mohanty A, Meena SS. Unlocking the potential of rhamnolipids: production via agro-industrial waste valorization, market insights, recent advances, and applications. *Biomass Convers Biorefin* 2025;15:28847–76. <https://doi.org/10.1007/s13399-025-06671-w>.
- [233] Vaidya AN, Pandey RA, Mudliar S, Kumar MS, Chakrabarti T, Devotta S. Production and Recovery of Lactic Acid for Polylactide—An Overview. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2005;35:429–67. <https://doi.org/10.1080/10643380590966181>.
- [234] Rodrigues AKO, Maia DLH, Fernandes FAN. Production of lactic acid from glycerol by applying an alkaline hydrothermal process using homogeneous catalysts and high glycerol concentration. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2015;32:749–55. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20150323s00003356>.
- [235] Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *J Biosci Bioeng* 2015;119:10–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.003>.
- [236] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *J Biotechnol* 2011;156:286–301. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2011.06.017>.
- [237] Johanson A, Goel A, Olsson L, Franzén CJ. Respiratory Physiology of *Lactococcus lactis* in Chemostat Cultures and Its Effect on Cellular Robustness in Frozen and Freeze-Dried Starter Cultures. *Appl Environ Microbiol* 2020;86. <https://doi.org/10.1128/AEM.02785-19>.
- [238] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. *Enzyme Microb Technol* 2000;26:87–107. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00155-6).
- [239] Ye L, Zhou X, Hudari MSB, Li Z, Wu JC. Highly efficient production of l-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresour Technol* 2013;132:38–44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.011>.
- [240] Augustiniene E, Valanciene E, Matulis P, Syrpas M, Jonuskiene I, Malys N. Bioproduction of L- and D-lactic acids: advances and trends in microbial strain application and engineering. *Crit Rev Biotechnol* 2022;42:342–60. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1940088>.

- [241] Ahmad A, Banat F, Taher H. A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges. *Environ Technol Innov* 2020;20:101138. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101138>.
- [242] International Energy Agency (IEA). Outlook for biogas and Prospects for organic growth: World Energy Outlook Special Report biomethane. Paris: 2020.
- [243] Balat M. Global Bio-Fuel Processing and Production Trends. *Energy Exploration & Exploitation* 2007;25:195–218. <https://doi.org/10.1260/014459807782009204>.
- [244] Krylova AY, Kozyukov EA, Lapidus AL. Ethanol and diesel fuel from plant raw materials: A review. *Solid Fuel Chemistry* 2008;42:358–64. <https://doi.org/10.3103/S0361521908060062>.
- [245] Specification for Denatured Fuel Ethanol for Blending with Gasolines for Use as Automotive Spark-Ignition Engine Fuel 2021. <https://doi.org/10.1520/D4806-21A>.
- [246] Kazmi A, Sultana T, Ali A, Nijabat A, Li G, Hou H. Innovations in bioethanol production: A comprehensive review of feedstock generations and technology advances. *Energy Strategy Reviews* 2025;57:101634. <https://doi.org/10.1016/j.esr.2024.101634>.
- [247] Jambo SA, Abdulla R, Mohd Azhar SH, Marbawi H, Gansau JA, Ravindra P. A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2016;65:756–69. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064>.
- [248] Nogueira CC, Padilha CEA, Dantas JMM, Medeiros FGM, Guilherme AA, Souza DFS, et al. In-situ detoxification strategies to boost bioalcohol production from lignocellulosic biomass. *Renew Energy* 2021;180:914–36. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.09.012>.
- [249] Li Y, Song W, Han X, Wang Y, Rao S, Zhang Q, et al. Recent progress in key lignocellulosic enzymes: Enzyme discovery, molecular modifications, production, and enzymatic biomass saccharification. *Bioresour Technol* 2022;363:127986. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127986>.
- [250] Hamelinck CN, Hooijdonk G, Faaij APC. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenergy* 2005;28:384–410. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.09.002>.
- [251] Robak K, Balcerk M. Current state-of-the-art in ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Microbiol Res* 2020;240:126534. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126534>.
- [252] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56:17–34. <https://doi.org/10.1007/s002530100624>.
- [253] Vohra M, Manwar J, Manmode R, Padgilwar S, Patil S. Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *J Environ Chem Eng* 2014;2:573–84. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013>.
- [254] Liu L, Zhang Z, Wang J, Fan Y, Shi W, Liu X, et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation of corn stover pretreated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative degradation for ethanol production. *Energy* 2019;168:946–52. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.11.132>.
- [255] Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew Energy* 2012;37:19–27. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>.
- [256] Sulewski P, Ignaciuk W, Szymańska M, Wąs A. Development of the Biomethane Market in Europe. *Energies (Basel)* 2023;16:2001. <https://doi.org/10.3390/en16042001>.
- [257] Zamorano-López N, Borrás L, Seco A, Aguado D. Unveiling microbial structures during raw microalgae digestion and co-digestion with primary sludge to produce biogas using semi-continuous AnMBR systems. *Science of The Total Environment* 2020;699:134365. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134365>.
- [258] Li Y, Park SY, Zhu J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2011;15:821–6. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.042>.
- [259] Angelidaki I, Karakashev D, Batstone DJ, Plugge CM, Stams AJM. Biomethanation and Its Potential, 2011, p. 327–51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0>.

- [260] Khanh Nguyen V, Kumar Chaudhary D, Hari Dahal R, Hoang Trinh N, Kim J, Chang SW, et al. Review on pretreatment techniques to improve anaerobic digestion of sewage sludge. *Fuel* 2021;285:119105. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119105>.
- [261] Walter A, Probst M, Franke-Whittle IH, Ebner C, Podmirseg SM, Etemadi-Shalamzari M, et al. Microbiota in anaerobic digestion of sewage sludge with and without co-substrates. *Water and Environment Journal* 2019;33:214–22. <https://doi.org/10.1111/wej.12392>.
- [262] Rivière D, Desvignes V, Pelletier E, Chaussonnerie S, Guermazi S, Weissenbach J, et al. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J* 2009;3:700–14. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.2>.
- [263] Moraes BS, Zaiat M, Bonomi A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2015;44:888–903. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.023>.
- [264] Gunes B, Stokes J, Davis P, Connolly C, Lawler J. Pre-treatments to enhance biogas yield and quality from anaerobic digestion of whiskey distillery and brewery wastes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2019;113:109281. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109281>.
- [265] Zhou J, Zhang R, Liu F, Yong X, Wu X, Zheng T, et al. Biogas production and microbial community shift through neutral pH control during the anaerobic digestion of pig manure. *Bioresour Technol* 2016;217:44–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.077>.
- [266] Appels L, Baeyens J, Degève J, Dewil R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog Energy Combust Sci* 2008;34:755–81. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>.
- [267] Cai D, Deng L, Wu J, Su C, Wu Y, Bi H, et al. Alkali pretreated corn stalk combined with enzyme cocktail at low cellulase dosage for the high-titer L-lactic acid production. *Ind Crops Prod* 2025;224:120332. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120332>.
- [268] Yang X, Shi Z, Wang T, Meng X, Song L, Zhang Z, et al. Fermentative L-Lactic Acid Production Using *Bacillus coagulans* from Corn Stalk Deconstructed by an Anaerobic Microbial Community. *Fermentation* 2023;9:611. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070611>.
- [269] Yang Y, Wang Y, Lu X, Zheng X, Yan D, Xin J, et al. Highly efficient enzymolysis and fermentation of corn stalk into L-lactic acid by enzyme-bacteria friendly ionic liquid pretreatment. *Green Chemical Engineering* 2022;3:321–7. <https://doi.org/10.1016/j.gce.2021.11.003>.
- [270] Wang X, Wang G, Yu X, Chen H, Sun Y, Chen G. Pretreatment of corn stover by solid acid for d-lactic acid fermentation. *Bioresour Technol* 2017;239:490–5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.089>.
- [271] Bai Z, Gao Z, He B, Wu B. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on the growth and d-lactic acid production of *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5. *Bioprocess Biosyst Eng* 2015;38:1993–2001. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1440-5>.
- [272] Wang Y, Liu J, Cai D, Zhao G. Co-generation of ethanol and l-lactic acid from corn stalk under a hybrid process. *Biotechnol Biofuels* 2018;11:331. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1330-6>.
- [273] Shafiei Alavijeh R, Karimi K, van den Berg C. An integrated and optimized process for cleaner production of ethanol and biodiesel from corn stover by *Mucor indicus*. *J Clean Prod* 2020;249:119321. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119321>.
- [274] Kim I, Seo YH, Kim GY, Han JI. Co-production of bioethanol and biodiesel from corn stover pretreated with nitric acid. *Fuel* 2015;143:285–9. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.11.031>.
- [275] Liu J, Wang C, Zhao X, Yin F, Yang H, Wu K, et al. Bioethanol production from corn straw pretreated with deep eutectic solvents. *Electronic Journal of Biotechnology* 2023;62:27–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.12.004>.

- [276] Sun W, Li X, Zhao J, Qin Y. Pretreatment Strategies to Enhance Enzymatic Hydrolysis and Cellulosic Ethanol Production for Biorefinery of Corn Stover. *Int J Mol Sci* 2022;23:13163. <https://doi.org/10.3390/ijms232113163>.
- [277] García-Torreiro M, López-Abelairas M, Lu-Chau TA, Lema JM. Fungal pretreatment of agricultural residues for bioethanol production. *Ind Crops Prod* 2016;89:486–92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.036>.
- [278] Sun C, Liu R, Cao W, Yin R, Mei Y, Zhang L. Impacts of Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatment on Chemical Composition and Biochemical Methane Potential of Agricultural Crop Stalks. *Energy & Fuels* 2015;29:4966–75. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b00838>.
- [279] Sha H, Cao S, Zhao B, Dong Z, Wang G, Duan J. Effect of alkaline deep eutectic solvents pretreatment on CH<sub>4</sub> yield from anaerobic digestion of corn stover. *Energy* 2024;302:131683. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2024.131683>.
- [280] Zhao X, Zheng Z, Cai Y, Zhao Y, Zhang Y, Gao Y, et al. Accelerated biomethane production from lignocellulosic biomass: Pretreated by mixed enzymes secreted by *Trichoderma viride* and *Aspergillus* sp. *Bioresour Technol* 2020;309:123378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123378>.
- [281] Lizasoain J, Trulea A, Gittinger J, Kral I, Piringer G, Schedl A, et al. Corn stover for biogas production: Effect of steam explosion pretreatment on the gas yields and on the biodegradation kinetics of the primary structural compounds. *Bioresour Technol* 2017;244:949–56. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.042>.
- [282] Wright A, Rollinson A, Yadav D, Lisowski S, Iza F, Holdich R, et al. Plasma-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Food and Bioproducts Processing* 2020;124:287–95. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.09.005>.
- [283] Lu Q, Yan D, Wu P, Chen L, Yagoub AEA, Ji Q, et al. Ultrasound-NATDES/DMSO system for corn straw biomass conversion into platform compounds. *Renew Energy* 2022;190:675–83. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.03.154>.
- [284] Liu ZH, Olson ML, Shinde S, Wang X, Hao N, Yoo CG, et al. Synergistic maximization of the carbohydrate output and lignin processability by combinatorial pretreatment. *Green Chem* 2017;19:4939–55. <https://doi.org/10.1039/C7GC02057K>.
- [285] Zaplotnik R, Kregar Z, Bišćan M, Vesel A, Cvelbar U, Mozetič M, et al. Multiple vs. single harmonics AC-driven atmospheric plasma jet. *EPL (Europhysics Letters)* 2014;106:25001. <https://doi.org/10.1209/0295-5075/106/25001>.
- [286] Karthikeyan PK, Grbic J, Iza F, Bandulasena HCH, Radu T. Microbubble Plasma-Assisted Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biogas Generation. *Waste Biomass Valorization* 2025. <https://doi.org/10.1007/s12649-025-03015-7>.
- [287] Wright A, Taglioli M, Montazersadgh F, Shaw A, Iza F, Bandulasena HCH. Microbubble-enhanced DBD plasma reactor: Design, characterisation and modelling. *Chemical Engineering Research and Design* 2019;144:159–73. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.01.030>.
- [288] Ruiz-Aguirre A, Polo-López MI, Fernández-Ibáñez P, Zaragoza G. Integration of Membrane Distillation with solar photo-Fenton for purification of water contaminated with *Bacillus* sp. and *Clostridium* sp. spores. *Science of The Total Environment* 2017;595:110–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.238>.
- [289] Kanazawa S, Kawano H, Watanabe S, Furuki T, Akamine S, Ichiki R, et al. Observation of OH radicals produced by pulsed discharges on the surface of a liquid. *Plasma Sources Sci Technol* 2011;20:034010. <https://doi.org/10.1088/0963-0252/20/3/034010>.
- [290] Su Y, Du R, Guo H, Cao M, Wu Q, Su R, et al. Fractional pretreatment of lignocellulose by alkaline hydrogen peroxide: Characterization of its major components. *Food and Bioproducts Processing* 2015;94:322–30. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.04.001>.
- [291] Roy RK. *A Primer on The Taguchi Method* : Second Edition 2010:304.
- [292] Omar KA, Sadeghi R. Physicochemical properties of deep eutectic solvents: A review. *J Mol Liq* 2022;360:119524. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119524>.

- [293] Mamilla JLK, Novak U, Grilc M, Likozar B. Natural deep eutectic solvents (DES) for fractionation of waste lignocellulosic biomass and its cascade conversion to value-added bio-based chemicals. *Biomass Bioenergy* 2019;120:417–25. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.002>.
- [294] Arora DS, Gill PK. Production of Ligninolytic Enzymes by *Phlebia Floridensis*. *World J Microbiol Biotechnol* 2005;21:1021–8. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-7655-2>.
- [295] Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 1972;48:422–7. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90094-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90094-2).
- [296] Xu N, Zhang W, Ren S, Liu F, Zhao C, Liao H, et al. Hemicelluloses negatively affect lignocellulose crystallinity for high biomass digestibility under NaOH and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pretreatments in *Miscanthus*. *Biotechnol Biofuels* 2012;5. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-58>.
- [297] Fry SC. *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*. London: Longman; 1988.
- [298] Dische Z. Color reactions of carbohydrates. In: Whistler RL, Wolfrom ML, editors. *Methods in carbohydrate chemistry*, New York: Academic Press; 1962, p. 477–512.
- [299] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid for determining reducing sugars. *Analitical Chemistry* 1959;31:426–8.
- [300] Goering HK (Harold K, Van Soest PJ. *Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications* 1970.
- [301] Mladenović D. *Agro-industrijski otpad kao supstrat za proizvodnju mlečne kiseline, mikrobne biomase i hrane za životinje*. Doktorska disertacija. Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2019.
- [302] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: Laboratory analytical procedure (LAP). 2008.
- [303] Fukushima RS, Hatfield RD. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. *J Agric Food Chem* 2001;49:3133–9. <https://doi.org/10.1021/jf010449r>.
- [304] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 1995;28:25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- [305] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1231–7. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- [306] García A, González Alriols M, Spigno G, Labidi J. Lignin as natural radical scavenger. Effect of the obtaining and purification processes on the antioxidant behaviour of lignin. *Biochem Eng J* 2012;67:173–85. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.06.013>.
- [307] Djukić-Vuković A. *Proizvodnja mlečne kiseline i probiotske biomase na destilerijskoj džibri*. Doktorska disertacija. Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2013.
- [308] Guo Q, Wu Q, Bai D, Liu Y, Chen L, Jin S, et al. Potential Use of Dimethyl Sulfoxide in Treatment of Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:7159–69. <https://doi.org/10.1128/AAC.01357-16>.
- [309] Rice EW, Bridgewater L, American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. vol. 10. Washington, DC: American public health association; 2012.
- [310] A.O.A.C. *Official methods of analysis of Association of Official Agricultural Chemists* 1999.
- [311] ASTM D5865-10a. *Test Method for Gross Calorific Value of Coal and Coke* 2010. <https://doi.org/10.1520/D5865-10A>.
- [312] Srebotnik E, Messner K. A Simple Method That Uses Differential Staining and Light Microscopy To Assess the Selectivity of Wood Delignification by White Rot Fungi. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:1383. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.4.1383-1386.1994>.

- [313] Xiao L-P, Lin Z, Peng W-X, Yuan T-Q, Xu F, Li N-C, et al. Unraveling the structural characteristics of lignin in hydrothermal pretreated fibers and manufactured binderless boards from *Eucalyptus grandis*. *Sustainable Chemical Processes* 2014 2:1 2014;2:1–12. <https://doi.org/10.1186/2043-7129-2-9>.
- [314] Ewanick S, Schmitt E, Gustafson R, Bura R. Use of Raman spectroscopy for continuous monitoring and control of lignocellulosic biorefinery processes. *Pure and Applied Chemistry* 2014;86:867–79. <https://doi.org/10.1515/pac-2013-1022>.
- [315] Ali N, Hamouda HI, Su H, Li F-L, Lu M. Combinations of alkaline hydrogen peroxide and lithium chloride/N,N-dimethylacetamide pretreatments of corn stalk for improved biomethanation. *Environ Res* 2020;186:109563. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109563>.
- [316] Megazyme, L/D lactic acid (L/D lactate) rapid assay, booklet. [Http://SecureMegazymeCom/Files/BOOKLET/K-DLATE\\_1212\\_DATAPdf.n.d](http://SecureMegazymeCom/Files/BOOKLET/K-DLATE_1212_DATAPdf.n.d).
- [317] Koch R. Über die neuen Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Mikrokosmen in Boden, Luft und Wasser. In: Gaffky G, Pfuhl E, Schwalbe J, editors. *Gesammelte Werke von Robert Koch*. Erster Band, Leipzig: Verlag Georg Thieme; 1883, p. 274–84.
- [318] Zhao P, Pu F, Su C, Wan Y, Huang T, Hou X, et al. Towards valorization of rice straw into bioethanol and lignin: Emphasizing critical role of deep eutectic solvent components in biorefining process. *Bioresour Technol* 2024;399:130635. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130635>.
- [319] AMPTS II & AMPTS II Light Automatic Methane Potential Test System Operation and Maintenance Manual. Scheelevator: 2022.
- [320] Symons GE, Buswell AM. The Methane Fermentation of Carbohydrates. *J Am Chem Soc* 1933;55:2028–36. <https://doi.org/10.1021/ja01332a039>.
- [321] Saravanan A, Yaashikaa PR, Kumar PS, Thamarai P, Deivayanai VC, Rangasamy G. A comprehensive review on techno-economic analysis of biomass valorization and conversional technologies of lignocellulosic residues. *Ind Crops Prod* 2023;200:116822. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116822>.
- [322] Sadhukhan J, Ng KS, Hernandez EM. *Biorefineries and chemical processes: design, integration and sustainability analysis*. Wiley; 2014.
- [323] Wu J, Fukazawa K, Ohtani J. Distribution of Syringyl and Guaiacyl Lignins in Hardwoods in Relation to Habitat and Porosity Form in Wood. *Holzforschung* 1992;46:181–6. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1992.46.3.181>.
- [324] Hatfield R, Fukushima RS. Can Lignin Be Accurately Measured? *Crop Sci* 2005;45:832–9. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0238>.
- [325] Moreira-Vilar FC, Siqueira-Soares R de C, Finger-Teixeira A, Oliveira DM de, Ferro AP, da Rocha GJ, et al. The Acetyl Bromide Method Is Faster, Simpler and Presents Best Recovery of Lignin in Different Herbaceous Tissues than Klason and Thioglycolic Acid Methods. *PLoS One* 2014;9:e110000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110000>.
- [326] Brinkmann K, Blaschke L, Polle A. Comparison of Different Methods for Lignin Determination as a Basis for Calibration of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy and Implications of Lignoproteins. *J Chem Ecol* 2002;28:2483–501. <https://doi.org/10.1023/A:1021484002582>.
- [327] Fukushima RS, Hatfield RD. Comparison of the Acetyl Bromide Spectrophotometric Method with Other Analytical Lignin Methods for Determining Lignin Concentration in Forage Samples. *J Agric Food Chem* 2004;52:3713–20. <https://doi.org/10.1021/jf0354971>.
- [328] Vlad I-E, Anghel SD. Time stability of water activated by different on-liquid atmospheric pressure plasmas. *J Electrostat* 2017;87:284–92. <https://doi.org/10.1016/j.elstat.2017.06.002>.
- [329] Pârvulescu VI, Magureanu M, Lukes P. *Plasma chemistry and catalysis in gases and liquids*. Wiley-VCH; 2013.
- [330] Čobanović R, Maletić D, Kocić-Tanackov S, Čabarkapa I, Kokić B, Kojić P, et al. Comparison of the Bacterial Inactivation Efficiency of Water Activated by a Plasma Jet Source and a Pin-

- to-Pin Electrode Configuration Source. Processes 2023;11:3286. <https://doi.org/10.3390/pr11123286>.
- [331] Wang S, Gao W, Chen K, Xiang Z, Zeng J, Wang B, et al. Deconstruction of cellulosic fibers to fibrils based on enzymatic pretreatment. *Bioresour Technol* 2018;267:426–30. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.067>.
- [332] Wu C, McClements DJ, He M, Zheng L, Tian T, Teng F, et al. Preparation and characterization of okara nanocellulose fabricated using sonication or high-pressure homogenization treatments. *Carbohydr Polym* 2021;255:117364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117364>.
- [333] Egüés I, Eceiza A, Labidi J. Effect of different hemicelluloses characteristics on film forming properties. *Ind Crops Prod* 2013;47:331–8. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.031>.
- [334] Ruiz HA, Cerqueira MA, Silva HD, Rodríguez-Jasso RM, Vicente AA, Teixeira JA. Biorefinery valorization of autohydrolysis wheat straw hemicellulose to be applied in a polymer-blend film. *Carbohydr Polym* 2013;92:2154–62. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.054>.
- [335] Lu Y, Lu Y-C, Hu H-Q, Xie F-J, Wei X-Y, Fan X. Structural Characterization of Lignin and Its Degradation Products with Spectroscopic Methods. *Journal of Spectroscopy* 2017;2017:1–15. <https://doi.org/10.1155/2017/8951658>.
- [336] Zhou R, Zhou R, Wang S, Mihiri Ekanayake UG, Fang Z, Cullen PJ, et al. Power-to-chemicals: Low-temperature plasma for lignin depolymerisation in ethanol. *Bioresour Technol* 2020;318:123917. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123917>.
- [337] Kačuráková M, Wellner N, Ebringerová A, Hromádková Z, Wilson RH, Belton PS. Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. *Food Hydrocoll* 1999;13:35–41. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(98\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(98)00067-8).
- [338] Agarwal UP. An Overview of Raman Spectroscopy as Applied to Lignocellulosic Materials. In: Argyropoulos D, editor. *Advances in Lignocellulosics Characterization*, Tappi Press; 1999.
- [339] Ona T, Sonoda T, Ito K, Shibata M, Kato T, Ootake Y. Non-Destructive Determination of Hemicellulosic Neutral Sugar Composition in Native Wood by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 1998;18:27–41. <https://doi.org/10.1080/02773819809350123>.
- [340] Gogate PR, Pandit AB. A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods. *Advances in Environmental Research* 2004;8:553–97. [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(03)00031-5).
- [341] Grbić J, Mladenović D, Pavlović S, Lazović S, Mojović L, Djukić-Vuković A. Advanced oxidation processes in the treatment of corn stalks. *Sustain Chem Pharm* 2023;32:100962. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100962>.
- [342] Fernández de Dios MÁ, del Campo AG, Fernández FJ, Rodrigo M, Pazos M, Sanromán MÁ. Bacterial–fungal interactions enhance power generation in microbial fuel cells and drive dye decolourisation by an ex situ and in situ electro-Fenton process. *Bioresour Technol* 2013;148:39–46. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.084>.
- [343] Wu K, Yang K, Wang S, Yu J, Chu C, Luo B, et al. The enrichment of sugars and phenols from fast pyrolysis of bamboo via ethanol-Fenton pretreatment. *Bioresour Technol* 2022;356:127315. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127315>.
- [344] Kato DM, Elía N, Flythe M, Lynn BC. Pretreatment of lignocellulosic biomass using Fenton chemistry. *Bioresour Technol* 2014;162:273–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.151>.
- [345] Shu R, Long J, Yuan Z, Zhang Q, Wang T, Wang C, et al. Efficient and product-controlled depolymerization of lignin oriented by metal chloride cooperated with Pd/C. *Bioresour Technol* 2015;179:84–90. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.12.021>.

- [346] Emeruwa E, Jarrige J, Mexmain J, Bernardin M. Application of mercury porosimetry to powder (UO<sub>2</sub>) analysis. *Journal of Nuclear Materials* 1991;184:53–8. [https://doi.org/10.1016/0022-3115\(91\)90532-C](https://doi.org/10.1016/0022-3115(91)90532-C).
- [347] Zhang Y, Wu K, Yang Z, Ye G. A reappraisal of the ink-bottle effect and pore structure of cementitious materials using intrusion-extrusion cyclic mercury porosimetry. *Cem Concr Res* 2022;161:106942. <https://doi.org/10.1016/J.CEMCONRES.2022.106942>.
- [348] Shimizu S, Yokoyama T, Matsumoto Y. Effect of type of aromatic nucleus in lignin on the rate of the  $\beta$ -O-4 bond cleavage during alkaline pulping process. *Journal of Wood Science* 2015;61:529–36. <https://doi.org/10.1007/s10086-015-1488-5>.
- [349] Kayserilioglu B. Use of xylan, an agricultural by-product, in wheat gluten based biodegradable films: mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties. *Bioresour Technol* 2003;87:239–46. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00258-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00258-4).
- [350] Zhang K, Si M, Liu D, Zhuo S, Liu M, Liu H, et al. A bionic system with Fenton reaction and bacteria as a model for bioprocessing lignocellulosic biomass. *Biotechnol Biofuels* 2018;11:31.
- [351] Lupoi JS, Gjersing E, Davis MF. Evaluating Lignocellulosic Biomass, Its Derivatives, and Downstream Products with Raman Spectroscopy. *Front Bioeng Biotechnol* 2015;3. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00050>.
- [352] Aliasgharlou N, Cree DE, Wilson LD. Fenton-Based Treatment of Flax Biomass for Modification of Its Fiber Structure and Physicochemical Properties. *Applied Sciences* 2024;14:6133. <https://doi.org/10.3390/app14146133>.
- [353] Liu C, Wu S, Zhang H, Xiao R. Catalytic oxidation of lignin to valuable biomass-based platform chemicals: A review. *Fuel Processing Technology* 2019;191:181–201. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.04.007>.
- [354] Tran MH, Phan DP, Lee EY. Review on lignin modifications toward natural UV protection ingredient for lignin-based sunscreens. *Green Chemistry* 2021;23:4633–46. <https://doi.org/10.1039/D1GC01139A>.
- [355] Rullifank KF, Roefinal ME, Kostanti M, Sartika L, Evelyn. Pulp and paper industry: An overview on pulping technologies, factors, and challenges. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* 2020;845:012005. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/845/1/012005>.
- [356] Kim JS, Lee YY, Kim TH. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 2016;199:42–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>.
- [357] Alvarez-Vasco C, Zhang X. Alkaline hydrogen peroxide (AHP) pretreatment of softwood: Enhanced enzymatic hydrolysability at low peroxide loadings. *Biomass Bioenergy* 2017;96:96–102. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.11.005>.
- [358] Yang L, Ru Y, Xu S, Liu T, Tan L. Features correlated to improved enzymatic digestibility of corn stover subjected to alkaline hydrogen peroxide pretreatment. *Bioresour Technol* 2021;325. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124688>.
- [359] Sun Y-G, Ma Y-L, Wang L-Q, Wang F-Z, Wu Q-Q, Pan G-Y. Physicochemical properties of corn stalk after treatment using steam explosion coupled with acid or alkali. *Carbohydr Polym* 2015;117:486–93. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.066>.
- [360] Mierzejewska J, Dąbkowska K, Chreptowicz K, Sokołowska A. Hydrolyzed corn stover as a promising feedstock for 2-phenylethanol production by nonconventional yeast. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2019;94:777–84. <https://doi.org/10.1002/jctb.5823>.
- [361] Yu H, Du W, Zhang J, Ma F, Zhang X, Zhong W. Fungal treatment of cornstalks enhances the delignification and xylan loss during mild alkaline pretreatment and enzymatic digestibility of glucan. *Bioresour Technol* 2010;101:6728–34. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.119>.
- [362] Morales A, Gullón B, Dávila I, Eibes G, Labidi J, Gullón P. Optimization of alkaline pretreatment for the co-production of biopolymer lignin and bioethanol from chestnut shells following a biorefinery approach. *Ind Crops Prod* 2018;124:582–92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.032>.

- [363] Al Azad S, Madadi M, Song G, Sun C, Sun F. New trends in microbial lipid-based biorefinery for fermentative bioenergy production from lignocellulosic biomass. *Biofuel Research Journal* 2024;11:2040–64. <https://doi.org/10.18331/BRJ2024.11.1.5>.
- [364] Pallapolu VR, Shi S, Kang L, Kothari U, Li J. Boost Effect of Water-Soluble Polymers on Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Ind Eng Chem Res* 2020;59:5186–93. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b05850>.
- [365] Xia Y, Liu Q, Hu X, Li X, Huang Y, Li W, et al. Structural evolution during corn stalk acidic and alkaline hydrogen peroxide pretreatment. *Ind Crops Prod* 2022;176:114386. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114386>.
- [366] Gómez-García R, Sousa SC, Ramos ÓL, Campos DA, Aguilar CN, Madureira AR, et al. Obtention and Characterization of Microcrystalline Cellulose from Industrial Melon Residues Following a Biorefinery Approach. *Molecules* 2024;29:3285. <https://doi.org/10.3390/molecules29143285>.
- [367] Azum N, Jawaid M, Kian LK, Khan A, Alotaibi MM. Extraction of Microcrystalline Cellulose from Washingtonia Fibre and Its Characterization. *Polymers (Basel)* 2021;13:3030. <https://doi.org/10.3390/polym13183030>.
- [368] Zhang MF, Qin YH, Ma JY, Yang L, Wu ZK, Wang TL, et al. Depolymerization of microcrystalline cellulose by the combination of ultrasound and Fenton reagent. *Ultrason Sonochem* 2016;31:404–8. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.027>.
- [369] Liu Y, Nguyen A, Allen A, Zoldan J, Huang Y, Chen JY. Regenerated cellulose micro-nano fiber matrices for transdermal drug release. *Materials Science and Engineering: C* 2017;74:485–92. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.048>.
- [370] Kim JS, Awano T, Yoshinaga A, Takabe K. Temporal and spatial immunolocalization of glucomannans in differentiating earlywood tracheid cell walls of *Cryptomeria japonica*. *Planta* 2010;232:545–54. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1189-7>.
- [371] Li W, Ye J, Jia Z, Yu H, Li L, Wang H, et al. The full utilization of bagasse via deep eutectic solvent pretreatment for low-condensed lignin and cellulose smart indicator film. *Chemical Engineering Journal* 2024;492:151653. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.151653>.
- [372] Low LE, Teh KC, Siva SP, Chew IML, Mwangi WW, Chew CL, et al. Lignin nanoparticles: The next green nanoreinforcer with wide opportunity. *Environ Nanotechnol Monit Manag* 2021;15:100398. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100398>.
- [373] Thielke MW, Lopez Guzman S, Victoria Tafoya JP, García Tamayo E, Castro Herazo CI, Hosseinaei O, et al. Full Lignin-Derived Electrospun Carbon Materials as Electrodes for Supercapacitors. *Front Mater* 2022;9. <https://doi.org/10.3389/fmats.2022.859872>.
- [374] Breiner M, Zirbes M, Waldvogel SR. Comprehensive valorisation of technically relevant organosolv lignins *via* anodic oxidation. *Green Chemistry* 2021;23:6449–55. <https://doi.org/10.1039/D1GC01995C>.
- [375] Pretsch E, Buhlmann P, Badertscher M. *Structure Determination of Organic Compounds*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-93810-1>.
- [376] Grbić JZ, Mladenović DD, Veljković MB, Lazarević SS, Lević SM, Lazović SS, et al. Cold plasma/alkaline pretreatment facilitates corn stalk fractionation and valorization towards zero-waste approach. *Ind Crops Prod* 2024;222:119498. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119498>.
- [377] Leng W, He S, Lu B, Thirumalai RVKG, Nayanathara RMO, Shi J, et al. Raman imaging: An indispensable technique to comprehend the functionalization of lignocellulosic material. *Int J Biol Macromol* 2022;220:159–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.084>.
- [378] de Melo CML, da Cruz Filho IJ, de Sousa GF, de Souza Silva GA, do Nascimento Santos DKD, da Silva RS, et al. Lignin isolated from *Caesalpinia pulcherrima* leaves has antioxidant, antifungal and immunostimulatory activities. *Int J Biol Macromol* 2020;162:1725–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.003>.

- [379] You S, Xie Y, Zhuang X, Chen H, Qin Y, Cao J, et al. Effect of high antioxidant activity on bacteriostasis of lignin from sugarcane bagasse. *Biochem Eng J* 2022;180:108335. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108335>.
- [380] Sheng Y, Ma Z, Wang X, Han Y. Ethanol organosolv lignin from different agricultural residues: Toward basic structural units and antioxidant activity. *Food Chem* 2022;376:131895. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131895>.
- [381] Ebrahimi M, Ballester A, López-Rubio A, Acha V, Aussenac T, Martínez-Abad A. Antimicrobial and antioxidant properties of water-soluble lignin extracts obtained from ozonation of *Miscanthus giganteus* and *Vitis vinifera* in a pilot-scale reactor. *Ind Crops Prod* 2025;223:120092. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120092>.
- [382] Sun R. Fractional and structural characterization of hemicelluloses isolated by alkali and alkaline peroxide from barley straw. *Carbohydr Polym* 2002;49:415–23. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00349-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00349-6).
- [383] Schenzel K, Fischer S. NIR FT Raman Spectroscopy—a Rapid Analytical Tool for Detecting the Transformation of Cellulose Polymorphs. *Cellulose* 2001;8:49–57. <https://doi.org/10.1023/A:1016616920539>.
- [384] Ashokkumar V, Venkatkarthick R, Jayashree S, Chuetor S, Dharmaraj S, Kumar G, et al. Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts - A critical review. *Bioresour Technol* 2022;344:126195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126195>.
- [385] Xia Y, Zhuang J. Enhancing enzymatic saccharification and valuable lignin recovery from wheat straw using a novel ternary deep eutectic solvent pretreatment. *Ind Crops Prod* 2025;232:121245. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.121245>.
- [386] Devi PN, Sathiyabama J, Rajendran S. Study of surface morphology and inhibition efficiency of mild steel in simulated concrete pore solution by lactic acid–Zn<sup>2+</sup> system. *International Journal of Corrosion and Scale Inhibition* 2017;6. <https://doi.org/10.17675/2305-6894-2017-6-1-2>.
- [387] Alsabbagh A, Abu Saleem R, Almasri R, Aljarrah S, Awad S. Effects of gamma irradiation on 3D-printed polylactic acid (PLA) and high-density polyethylene (HDPE). *Polymer Bulletin* 2021;78:4931–45. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03349-3>.
- [388] Ravi T, Masri AN, Ibrahim IM. Choline-based Deep Eutectic Solvent for Extractive Oxidative Desulfurization of Model Oil. *E3S Web of Conferences* 2024;488:03004. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202448803004>.
- [389] Mulia K, Krisanti E, Terahadi F, Putri S. Selected Natural Deep Eutectic Solvents for the Extraction of  $\alpha$ -Mangostin from Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) Pericarp. *International Journal of Technology* 2015;6:1211. <https://doi.org/10.14716/ijtech.v6i7.1984>.
- [390] Feng Y, Eberhardt TL, Meng F, Xu C, Pan H. Efficient extraction of lignin from moso bamboo by microwave-assisted ternary deep eutectic solvent pretreatment for enhanced enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol* 2024;400:130666. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130666>.
- [391] da Costa Lopes AM, Gomes JRB, Coutinho JAP, Silvestre AJD. Novel insights into biomass delignification with acidic deep eutectic solvents: a mechanistic study of  $\beta$ -O-4 ether bond cleavage and the role of the halide counterion in the catalytic performance. *Green Chemistry* 2020;22:2474–87. <https://doi.org/10.1039/C9GC02569C>.
- [392] Wan G, Zhang Q, Li M, Jia Z, Guo C, Luo B, et al. How Pseudo-lignin Is Generated during Dilute Sulfuric Acid Pretreatment. *J Agric Food Chem* 2019;67:10116–25. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02851>.
- [393] Chang L, Sun Y, Gan L. Insights into cellulose deconstruction and pseudo-lignin formation during deep eutectic solvent treatment. *Cellulose* 2023;30:141–52. <https://doi.org/10.1007/s10570-022-04917-8>.
- [394] Horikawa Y, Hirano S, Mihashi A, Kobayashi Y, Zhai S, Sugiyama J. Prediction of Lignin Contents from Infrared Spectroscopy: Chemical Digestion and Lignin/Biomass Ratios of

- Cryptomeria japonica. *Appl Biochem Biotechnol* 2019;188:1066–76. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-02965-8>.
- [395] Ma CY, Sun Q, Xu LH, Zhang H, Wen JL, Li Z, et al. Recyclable and low-content deep eutectic solvent pretreatment at room temperature for fractionating uncondensed lignin and enhancing enzymatic saccharification. *Chemical Engineering Journal* 2025;507:160491. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.160491>.
- [396] Hu M, Yu Y, Liu Y. Integrated strategies for furfural production and lignocellulose fractionation in aqueous deep eutectic solvents. *Ind Crops Prod* 2023;204:117334. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117334>.
- [397] Zhang L, Zhao X, Chen L, Zhang X. Pretreatment with fermentable and recyclable deep eutectic solvent (DES) for improving resource utilization of biomass. *Ind Crops Prod* 2022;190:115868. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115868>.
- [398] Liu E, Segato F, Prade RA, Wilkins MR. Exploring lignin depolymerization by a bi-enzyme system containing aryl alcohol oxidase and lignin peroxidase in aqueous biocompatible ionic liquids. *Bioresour Technol* 2021;338:125564. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125564>.
- [399] Lu C, Xu J, Xie J, Zhu S, Wang B, Li J, et al. Preparation, characterization of light-colored lignin from corn stover by new ternary deep eutectic solvent extraction. *Int J Biol Macromol* 2022;222:2512–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.035>.
- [400] Ong VZ, Wu TY, Chu KKL, Sun WY, Shak KPY. A combined pretreatment with ultrasound-assisted alkaline solution and aqueous deep eutectic solvent for enhancing delignification and enzymatic hydrolysis from oil palm fronds. *Ind Crops Prod* 2021;160:112974. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112974>.
- [401] Xie J, Chen J, Cheng Z, Zhu S, Xu J. Pretreatment of pine lignocelluloses by recyclable deep eutectic solvent for elevated enzymatic saccharification and lignin nanoparticles extraction. *Carbohydr Polym* 2021;269:118321. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118321>.
- [402] Chen H, Li S, Cui Z, Feng T, Wang H, Ni Z, et al. Synergistic Degradation of Maize Straw Lignin by Manganese Peroxidase from *Irpex lacteus*. *Appl Biochem Biotechnol* 2023;195:3855–71. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04189-9>.
- [403] Zhang S, Dong Z, Shi J, Yang C, Fang Y, Chen G, et al. Enzymatic hydrolysis of corn stover lignin by laccase, lignin peroxidase, and manganese peroxidase. *Bioresour Technol* 2022;361:127699. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127699>.
- [404] Asgher M, Ahmad Z, Iqbal HMN. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. *Ind Crops Prod* 2013;44:488–95. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.005>.
- [405] Min K, Kim YH, Kim J, Kim Y, Gong G, Um Y. Effect of manganese peroxidase on the decomposition of cellulosic components: Direct cellulolytic activity and synergistic effect with cellulase. *Bioresour Technol* 2022;343:126138. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126138>.
- [406] Liu X, Ding S, Gao F, Wang Y, Taherzadeh MJ, Wang Y, et al. Exploring the cellulolytic and hemicellulolytic activities of manganese peroxidase for lignocellulose deconstruction. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 2023;16:139. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02386-0>.
- [407] Mulat DG, Dibdiakova J, Horn SJ. Microbial biogas production from hydrolysis lignin: insight into lignin structural changes. *Biotechnol Biofuels* 2018;11:61. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1054-7>.
- [408] Hidawati, Saraswaty V, Marganingrum D, Nissa RC, Abdullah AHD, Handayani S. The carrageenan fermentation process for (L)-lactic acid production using *Lactobacillus plantarum*: effect of fermentation time. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 2023;1201:012096. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1201/1/012096>.
- [409] Cremones PA, Teleken JG, Weiser Meier TR, Alves HJ. Two-Stage anaerobic digestion in agroindustrial waste treatment: A review. *J Environ Manage* 2021;281:111854. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111854>.

- [410] Yang D, Pang Y, Yuan H, Chen S, Ma J, Yu L, et al. Enhancing Biogas Production from Anaerobically Digested Wheat Straw Through Ammonia Pretreatment. *Chin J Chem Eng* 2014;22:576–82. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(14\)60075-6](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(14)60075-6).
- [411] Székács A. Environmental and Ecological Aspects in the Overall Assessment of Bioeconomy. *J Agric Environ Ethics* 2017;30:153–70. <https://doi.org/10.1007/s10806-017-9651-1>.
- [412] Karthikeyan PK, Iza F, Bandulasena HCH, Radu T. Enhanced biogas production from lignocellulosic biomass via integrated Fenton and plasma treatment. *Biomass Bioenergy* 2026;208:108812. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2025.108812>.

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Јована З. Грбић, рођена је 07.03.1994. године у Београду. Основну школу и Десету гимназију Михајло Пупин завршила је у Београду. Школске 2013/2014. године уписала је Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду, смер Биохемијско инжењерство и биотехнологија. Основне академске студије завршила је у септембру 2018. год. (просечна оцена 8,33). Мастер академске студије уписала је на истом факултету, на студијском програму Прехрамбена биотехнологија, а завршила у септембру 2019. год. (просечна оцена 9,22). Докторске академске студије је уписала школске 2019/2020. године на катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију, под менторством др Александре Ђукић-Вуковић, доцента Технолошко-металуршког факултета и др Саше Лазовића, научног саветника Института за физику Универзитета у Београду.

Од јануара 2020. год. запослена је као истраживач у Иновационом центру Технолошко-металуршког факултета. Ангажована је у настави на извођењу експерименталних вежби из Биотехнолошког практикума 2 и Фармацеутске биотехнологије, почевши од школске 2022/2023. године. Бави се радом са студентима основних и мастер студија током израде завршних и мастер радова. Од јануара 2023. год. ангажована је на пројекту *SparkGREEN*, финансираном од стране Алијансе међународних научних организација. Од октобра до децембра 2024. год. боравила је на Лофборо универзитету (Уједињено Краљевство), где је стекла искуство у области анаеробне дигестије.

Током досадашњег истраживачког рада аутор или коаутор је четири рада у међународним часописима (*M21a+*, *M21* и *M22*), четири рада у врхунском националном часопису (*M51*), 19 саопштења са међународног скупа штампаног у изводу (*M34*) и седам саопштења са скупа националног значаја штампаног у изводу (*M64*).

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јована Грбић

Број индекса 4024/2019

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Биотехнолошка валоризација фракција лигноцелулозне биомасе добијених

комбинованим третманима нетермалном плазмом

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, 11. фебруар 2026.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована Грбић

Број индекса 4024/2019

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада Биотехнолошка валоризација фракција лигноцелулозне биомасе  
добијених комбинованим третманима нетермалном плазмом

Ментор доц. др Александра Ђукић-Вуковић и др Саша Лазовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 11. фебруар 2026.

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Биотехнолошка валоризација фракција лигноцелулозне биомасе добијених

---

комбинованим третманима нетермалном плазмом

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 11. фебруар 2026.

---

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

## Оцена извештаја о провери оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Биотехнолошка валоризација фракција лигноцелулозне биомасе добијених комбинованим третманима нетермалном плазмом”, аутора Јоване Грбић, констатујем да утврђено подударање текста износи 16%. Овај степен подударности последица је детаљног описа примењених аналитичких метода и употребе одговарајућих скраћеница за поменуте методе, употребе личних имена, назива инструмената, и библиографских података других аутора уредно наведених и претходно публикованих радова кандидата проистеклих из дисертације и коришћених у изради ове докторске дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

11.02.2026. године

Ментори

---

Доц. др Александра Ђукић Вуковић, научни саветник  
Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду

---

Др Саша Лазовић, научни саветник  
Институт за физику Београд, Универзитет у Београду