Utjecaj biološke obrade pomoću Phanerochaete chrysosporium na udio fenolnih spojeva u tropu grožđa

Katalinić, Toni

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:840193

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Toni Katalinić

UTJECAJ BIOLOŠKE OBRADE POMOĆU *Phanerochaete chrysosporium* NA UDIO FENOLNIH SPOJEVA U TROPU GROŽĐA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za mehaničke, toplinske i separacijske procese
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska
Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje:	Biotehničke znanosti
Znanstveno polje:	Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet:	Jedinične operacije u procesnom inženjerstvu
Tema rada	je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2020./2021. održanoj 29. travnja 2021.
Mentor:	*prof. dr. sc. Mirela Planinić*
Pomoć pri izradi	*Gordana Šelo, mag. ing. proc.*

Utjecaj biološke obrade pomoću *Phanerochaete chrysosporium* na udio fenolnih spojeva u tropu grožđa

Toni Katalinić, 0113137986

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj biološke obrade tropa grožđa na udio fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima tropa grožđa prije i nakon biološke obrade pomoću gljive bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima tijekom 8 dana. *P. chrysosporium* je filamentozna gljiva koja pripada gljivama bijelog truljenja i razredu *Basidiomycetes* u carstvu gljiva koja tijekom svog rasta proizvodi kompleksni sustav enzima, koji kataliziraju različite biotransformacijske procese te na taj način razgrađuju složenu strukturu lignocelulozne biomase oslobađajući jednostavne polifenolne spojeve i povećavajući mogućnost njihove ekstrakcije. U ovom radu, tijekom 8 dana biološke obrade praćen je i određen gubitak na masi supstrata te udio/koncentracija: vlage, proteina, ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i proantocijanidina, kao i antioksidacijska aktivnost ekstrakata tropa grožđa. U ekstraktima tropa grožđa identificirano je i kvantificirano sedam fenolnih kiselina i četiri flavan-3-ola. Galna kiselina je fenolna kiselina koja je dokazana u najvećoj koncentraciji (0,322 $mg/g_{s.t.}$) nakon 7. dana biološke obrade, a maksimalna vrijednost masenog udjela flavan-3-ola (epikatehina, katehina, galokatehin galata i epikatehin galata) dokazana je u biološki neobrađenom uzorku tropa grožđa. Najveća antioksidacijska aktivnost ekstrakata dokazana je u početnom uzorku bez biološke obrade i u uzorku nakon 8. dana biološke obrade te je iznosila 0,21 $g_{TE}/g_{s.t.}$.

Ključne riječi: trop grožđa, fermentacija na čvrstim nosačima, *Phanerochaete chrysosporium*, fenolni spojevi

Ovaj diplomski rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Razvoj održivog integriranog procesa proizvodnje biološki aktivnih izolata iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije“ (POPI-WinCEco) (IP-2018-01-1227)

Rad sadrži:	slika: 27
	stranica: 49
	literarnih referenci: 64
Jezik izvornika:	hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1.	predsjednik:	prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić
2.	član-mentor:	prof. dr. sc. Mirela Planinić
3.	član:	izv. prof. dr. sc. Marina Tišma
4.	zamjena člana:	prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić

Datum obrane: 09. srpnja 2021.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process engineering
Subdepartment of Mechanical, thermal and separation processes
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia
Graduate program of Process engineering
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Unit operations in Process engineering
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII. held on April 29, 2021
Mentor: *Mirela Planinic, PhD, full professor*
Technical assistance: *Gordana Šelo, MSc*

Influence of Biological Treatment with *Phanerochaete chrysosporium* on the Profile of Phenolic Compounds in Grape Pomace

Toni Katalinić, 0113137986

Summary:

The aim of this study was to investigate the effect of biological treatment of grape pomace on phenolic compound content and antioxidant activity in grape pomace extracts before and after biological treatment with the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* under solid-state fermentation conditions for 8 days. *P. chrysosporium* is a filamentous fungus belonging to the white rot fungi and the class *Basidiomycetes* in the fungal kingdom. During its growth, it produces a complex system of enzymes that catalyze various biotransformation processes, degrading the complex structure of lignocellulosic biomass and releasing simple polyphenolic compounds and increasing their extractability. In this work, a substrate mass loss, content / concentration of moisture, proteins, total and individual polyphenolic compounds, total flavonoids and proanthocyanidins and antioxidant activity of grape pomace extracts were monitored during 8 days of biological treatment. Seven phenolic acids and four flavan-3-ol were identified and quantified in grape pomace extracts. Among the phenolic acids, gallic acid was detected in the highest concentration (0.322 mg/g_{db}) after the seventh day of biological treatment, while the maximum concentration of flavan-3-ols (epicatechin, catechin, epicatecih galate, galocatechin galate) was detected in the biologically untreated sample of grape pomace. The antioxidant activity of the extracts was the same and the highest in the original sample without biological treatment and in the sample after eight days of biological treatment and was 0.21 g_{TE}/g_{db}.

Key words: grape pomace, solid-state fermentation, *Phanerochaete chrysosporium*, phenolic compounds

Graduate thesis was supported by the Croatian Science Foundation under the project „Development of a sustainable integrated process for the production of bioactive isolates from food industry residues“ (POPI-WinCEco) (IP-2018-01-1227)

Thesis contains: figures: 27
pages: 49
references: 64

Orginal in: Croatian

Defense committee:

1. chair person: Ana Bucić-Kojić, PhD, full prof.
2. supervisior: Mirela Planinić, PhD, full prof.
3. member: Marina Tišma, PhD, associate prof.
4. stand-in: Daliborka Koceva Komlenić, PhD, full prof.

Defense date: July 09, 2021

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Mireli Planinić što mi je pružila priliku izrade diplomskog rada.

Velika Hvala asistentici Gordani Šelo, mag. ing. proc. na izdvojenom vremenu, strpljenju, susretljivosti i poticanju tijekom rada u laboratoriju i pisanja diplomskog rada.

Posebna zahvalnost mojim dragim roditeljima koji su mi omogućili studiranje i bili velika podrška tijekom svih ovih godina. Bez Vas ne bih nikada završio fakultet.

Veliko HVALA svima!

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. Fermentacija na čvrstim nosačima 4

2.2. Supstrati u fermentaciji na čvrstim nosačima 5

2.2.1. Škrobni supstrati 6

2.2.2. Lignocelulozni supstrati 7

2.2.3. Supstrati koji sadrže topljive šećere 8

2.2.4. Trop grožđa 8

2.3. Mikroorganizmi u fermentaciji na čvrstim nosačima 11

2.3.1. Gljive bijelog truljenja 13

2.3.2. *Phanerochaete chrysosporium* 14

3. EKSPERIMENTALNI DIO 15

3.1. Cilj i zadatak rada 16

3.2. Materijali i metode 16

3.2.1. Mikroorganizam 16

3.2.2. Supstrat 16

3.2.3. Kemikalije 17

3.2.4. Uređaji 17

3.2.5. Uzgoj i čuvanje kulture 21

3.2.6. Priprema uzorka za SSF 21

3.2.7. Obrada uzoraka nakon provedene fermentacije 22

3.2.8. Priprema ekstrakata za analize 22

3.2.9. Priprema ekstrakata za mjerenje pH vrijednosti 22

3.3. Analitičke metode 23

3.3.1. Određivanje koncentracije pojedinačnih polifenola UHPLC metodom 23

3.3.2. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu metodom 23

3.3.3. Određivanje ukupnih flavonoida 24

3.3.4. Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom 25

3.3.5. Određivanje ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina 25

3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom 26

4. REZULTATI I RASPRAVA 28
4.1. Gubitak na masi uzorka 29
4.2. pH vrijednost 30
4.3. Ukupni polifenolni spojevi 31
4.4. Ukupni flavonoidi 32
4.5. Proteini 32
4.6. Ukupni ekstraktibilni proantocijanidini 33
4.7. Antioksidacijska aktivnost 34
4.8. Pojedinačni polifenolni spojevi 34
5. ZAKLJUČCI 40
6. LITERATURA 43

Popis oznaka, kratica i simbola

OZNAKE:

C – maseni udio analizirane tvari u ekstraktu izražen na masu suhe tvari uzorka ($mg/g_{s.t.}$)

m – masa (g)

n – broj okretaja (min^{-1})

T – temperatura (°C)

t – vrijeme trajanja fermentacije (d)

KRATICE:

BSA – goveđi serumski albumin

CE – ekvivalent katehina

DPPH - 2,2-difenil-1-pikirilhidrazil radikal

GAE – ekvivalent galne kiseline

PDA – krumpirov dekstroza agar

s.t. – suha tvar

SSF – fermentacija na čvrstim nosačima (eng. solid-state fermentation)

TE – trolox ekvivalent

UHPLC – tekućinska kromatografija ultravioske djelotovornosti (eng. ultra high-preformace liquid chromatography)

1. UVOD

1. Uvod

Tijekom procesa prerade sirovina iz prehrambene i poljoprivredne industrije u konačni proizvod nastaju značajne količine proizvodnih ostataka (otprilike 30 % mase prerađene sirovine). Proizvodni ostaci se ne iskorištavaju dovoljno i zapravo se tretiraju kao otpad te njihovo neregulirano odlaganje u okoliš može dovesti do ozbiljnih problema za okoliš. Primjeri takvih proizvodnih ostataka su: komina, kora voća i povrća, ljuska, mekinje i klice žitarica, mahune, stabljike, komina zaostala nakon proizvodnje ulja itd. Zahvaljujući kemijskom sastavu, ovi proizvodni ostaci su lako dostupni izvori vrijednih komponenti poput polisaharida, proteina (enzima), dijetalnih vlakana, masnih kiselina, aroma i bioaktivnih spojeva koji se mogu primijeniti u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Brojna istraživanja bave se proizvodnjom i izolacijom bioaktivnih fenolnih spojeva biljnog porijekla zbog njihovih antioksidacijskih, protuupalnih, antialergijskih, antivirusnih, antikancerogenih, antimikrobnih i antimutagenih svojstava (Teixeira i sur., 2014).

Proizvodni ostaci iz prehrambene i poljoprivredne industrije uglavnom su lignocelulozni materijali koji se sastoje od celuloze (40-50 %), hemiceluloze (20-30 %) i lignina (20-35 %) (Hildén i Mäkelä, 2018). Značajan udio polifenola (posebno visoko polimeriziranih fenolnih spojeva), koji imaju brojne pozitivne učinke na zdravlje ljudi, uključen je u složenu strukturu lignina, stoga ih je teško ekstrahirati konvencionalnim postupcima ekstrakcije (Yu i Ahmedna, 2013). Ekstrakcija fenolnih spojeva slabe topljivosti zahtijeva dodatne procese razgradnje, uglavnom kiselinsku hidrolizu ili primjenu komercijalnih enzima. Međutim, te metode povećavaju troškove proizvodnje i mogu biti ekološki neprihvatljive (Bucić-Kojić i sur., 2017a).

U posljednje vrijeme raste interes za razvoj bioprocesa za proizvodnju, odnosno ekstrakciju biološki aktivnih komponenti na ekološki prihvatljiv način. Jedan od spomenutih bioprocesa je uzgoj mikroorganizama na čvrstim nosačima ili *solid-state* fermentacija (SSF), koja ima potencijal konverzije proizvodnih ostataka u visokovrijedne produkte poput fenolnih spojeva (Marzo i sur., 2019). Ova tehnologija temelji se na uzgoju odgovarajućeg mikroorganizma na proizvodnim ostacima, koji mikroorganizmu istodobno služe i kao nosač i kao supstrat. Zbog kompleksnog enzimskog sustava koji posjeduju određeni mikroorganizmi dolazi do razgradnje složene polimerne strukture te do oslobađanja fenolnih spojeva okruženih frakcijom lignina, čineći ih tada lakše dostupnima za ekstrakciju. U ovom diplomskog radu ispitan je utjecaj biološke obrade tropa grožđa sorte cabernet sauvignon pomoću gljive bijelog truljenja *Phanerochaete chrysosporium* na ekstraktibilnost fenolnih spojeva

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Fermentacija na čvrstim nosačima

Procesi fermentacije mogu se podijeliti na submerznu fermentaciju, kada se mikroorganizmi uzgajaju u tekućoj hranjivoj podlozi, i fermentaciju na čvrstim nosačima, odnosno *solid-state* fermentaciju (SSF), koja predstavlja uzgoj mikroorganizama na inertnoj ili ne-inertnoj čvrstoj podlozi, u kontroliranim uvjetima. Tijekom SSF procesa mikroorganizami se uzgajaju na supstratu koji ne sadrži ili sadrži vrlo malo slobodne vode. U takvim sustavima, voda se nalazi unutar čestica čvrstog materijala, a može biti i u obliku tankog filma na površini čestica ili u obliku kapljica između čestica. Čvrsti materijal odnosno supstrat je najčešće izvor ugljika i drugih hranjivih tvari, međutim, može se provesti i dodatno prihranjivanje s tvarima potrebnim za rast određenog mikroorganizma. U nekim slučajevima čvrsti materijal je potpuno inertan te služi samo kao nosač, u kojemu je apsorbirana hranjiva otopina (Mitchell i sur., 2006; Thomas i sur., 2013).

SSF proces uključuje primjenu gljiva, bakterija i kvasaca. Najčešće se primjenjuju filamentozne gljive, upravo zbog toga što je SSF tehnologija koja oponaša životne uvjete rasta filamentoznih gljiva u okolišu (Sadh i sur., 2018). Da bi se razvio pouzdan i ponovljiv SSF proces, isti bi se trebao provoditi pod kontroliranim uvjetima u različitim vrstama bioreaktora, kao što su bioreaktori s pliticama, bioreaktori s rotirajućim diskom, bioreaktori s čvrstim i lebdećim slojem, rotirajući horizontalni bioreaktori s miješalom, bioreaktori s mehaničkim miješalom, bioreaktori s miješanjem pomoću zraka i imerzni bioreaktori (Mitchell i Krieger, 2019; Planinić i sur., 2016).

Uzgoj na čvrstim supstratima se razlikuje od submerznog uzgoja po brojnim karakteristikama. Najveće prednosti SSF-a u odnosu na submerznu fermentaciju su veći prinosi proizvodnje, niži troškovi zbog korištenja jeftinih proizvodnih ostataka poljoprivredne i prehrambene industrije kao supstrata, manja upotreba vode, manje korištenih kemikalija, stvaranje manje otpada, manja potrošnja energije i manji troškovi potrebne opreme za provođenje procesa (Jain i sur., 2013; Mitchell i Krieger, 2019; Rodríguez Couto, 2008; Singhania i sur., 2009). Nedostaci SSF-a su heterogenost sustava, kontrola i održavanje optimalne temperature i pH, određivanje koncentracije biomase, poteškoće uzorkovanja tijekom fermentacije radi kontinuiranog praćenja kemijskog sastava supstrata i akumulacije proizvoda, pročišćavanje krajnjih produkata, te otežan prijenos tvari i topline, kao i zahtjevno prevođenje procesa u veće mjerilo

(Singhania i sur., 2009). Unatoč prednostima, navedeni nedostaci ostavljaju prostor za istraživanje i poboljšanje cjelokupnog SSF procesa.

Najvažniji čimbenici koji utječu na učinkovitost SSF procesa su: supstrat (kemijski sastav, vlaga, veličina čestica), inokulum (koncentracija, starost, morfologija), dodatak vanjskog izvora ugljika i dušika, specifični induktori enzima za rast mikroorganizama i željenu proizvodnju metabolita, miješanje, temperatura, pH i koncentracija kisika. Kada supstrat ne sadrži potrebne količine hranjivih sastojaka, za optimalan rast i metabolizam mikroorganizama potrebno je dodati neke makro i mikro nutrijente (Farinas, 2015; Soccol i sur., 2017). Makronutrijenti su potrebni u koncentracijama većim od 10^{-4} M. Glavni elementi su ugljik, dušik, kisik, vodik, sumpor, fosfor, Mg^{2+} i K^{+}. Ugljik i njegovi spojevi u hranjivoj podlozi glavni su izvori energije. Mikroelementi su potrebni u koncentraciji manjoj od 10^{-4} M. Elementi u tragovima kao što su Mo^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Na^{+} te vitamini, hormoni rasta i metabolički prekursori ubrajaju se u mikroelemente (Mitchell i Krieger, 2019). Danas se SSF procesima mogu dobiti različiti biotehnoloških proizvodi poput enzim, organskih kiselina, antibiotika, vitamina, hrane i krmiva, organskih molekula, aroma, pigmenata, biopolimera, biopesticida, a ova tehnologija ima primjenu u industrijskim bioprocesima poput bioremedijacije, bioaugmentacije i biopulpiranja (Mitchell i sur., 2002; Pandey i sur., 2000).

2.2. Supstrati u fermentaciji na čvrstim nosačima

Supstrati u SSF-u mogu biti čvrsti materijali koji sadrže hranjive tvari i koji služe kao medij za rast mikroorganizama. Veličina čestica i oblik supstrata mogu utjecati na dostupnost hranjivih sastojaka mikroorganizmu. Manje čestice supstrata između sebe tvore manje slobodne prostore i veće tlakove kada zrak prolazi kroz masu supstrata. Manje čestice imaju veću ukupnu površinu, ali istodobno imaju tendenciju da „leže“ na ravnim površinama i dodiruju se te na taj način isključuju pristup kisiku, ograničavajući rast mikroorganizama (Mitchell i sur., 2006).

Udio vlage supstrata jedan je od najvažnijih parametara koji utječe na cjelokupan proces fermentacije. Ukoliko je udio vlage previsok, praznine u čvrstom materijalu se popunjavaju vodom te je difuzija plina ograničena. Ukoliko je udio vlage prenizak, to ograničava rast mikroorganizama. Optimalni udio vlage ovisi o supstratu i mikroorganizmu koji se koriste

(Pirota i sur., 2013), a mijenja se tijekom procesa fermentacije. Voda djelomično isparava, ali istodobno i nastaje metabolizmom mikroorganizama. Ukoliko je proizvodnja metaboličke vode veća od isparene vode, tada se udio vode smanjuje. Konačni udio vode je zbroj početnog sadržaja vode i vode nastale metabolizmom gljiva, od čega se oduzme voda uklonjena isparavanjem / hlapljenjem (Planinić i sur., 2016).

Čvrsti supstrati koji se koriste u SSF-u obično se dobivaju iz organskih ostataka koji potječu iz poljoprivredne, prehrambene i šumarske industrije. U praksi su to često ostaci ili nusproizvodi žitarica, poljoprivredni otpad i otpad iz prehrambene industrije (npr. pšenične mekinje, kukuruzna silaža, sjemenke grožđa, trop grožđa i sl.), a ponekad se koriste i materijali poput cjelovitih žitarica. Ovi supstrati obično sadrže složene smjese izvora ugljika, uključujući lignin, celulozu, hemicelulozu, škrob i topljive šećere. U većini slučajeva, prije upotrebe potrebno ih je termički, kemijski ili mehanički obraditi kako bi se dobile čestice odgovarajuće veličine te kako bi se materijal pripremio za prikladan rast mikroorganizma (Mitchell i Krieger, 2019).

Ovisno o namjeni (proizvodnja željenih enzima, fenolnih spojeva, organskih kiselina ili bilo kojeg drugog vrijednog proizvoda, upotreba za proizvodnju biogoriva, upotreba za pripremu hrane), važno je poznavati kemijski sastav supstrata te odabrati prikladan mikroorganizam. S obzirom na izvore ugljika koje sadrže, Mitchell i sur. (2002) svrstavaju supstrate za SSF u tri skupine:

- škrobni supstrati (sadrže škrob kao glavni izvor ugljika)
- lignocelulozni supstrati (sadrže celulozu i lignocelulozu kao glavni izvor ugljika)
- supstrati koji sadrže uglavnom topljive šećere.

2.2.1. Škrobni supstrati

Mikroorganizmi koji posjeduju amilaze mogu koristiti škrob kao supstrat. Razgradnja škroba obično je najbolja ako mikroorganizmi posjeduju kombinaciju glukoamilaze i alfa-amilaze. Škrobni supstrati koji se koriste u SSF procesima uključuju rižu, manioku, pšenične i rižine mekinje, krupicu manioke, sjeme heljde, kukuruznu krupicu, ostatak batata i brašno od banane. Neki od ovih supstrata predstavljaju cjelovitu hranjivu podlogu za uzgoj mikroorganizama, primjerice riža, dok drugima trebaju dodaci hranjivih tvari kao u slučaju manioke (**slika 1**), kojoj se mora dodati izvor dušika. Škrobne sirovine ponekad je potrebno

predobraditi postupcima koji uključuju kuhanje ili parenje radi želatinizacije škroba, meljavu, struganje ili sjeckanje radi usitnjavanja čestica, „perlanje“ (eng. pearling) radi pretvorbe finog praha u čestice promjera više milimetara te lomljenje zrna riže ili pšenice, kako bi se unutrašnjost učinila dostupnijom. U slučaju sirovina ovoga tipa, često se javlja problem ljepljivosti što dovodi do aglomeracije čestica te je onemogućen pristup zraku i ometan rast radnog mikroorganizma (Mitchell i sur., 2002).

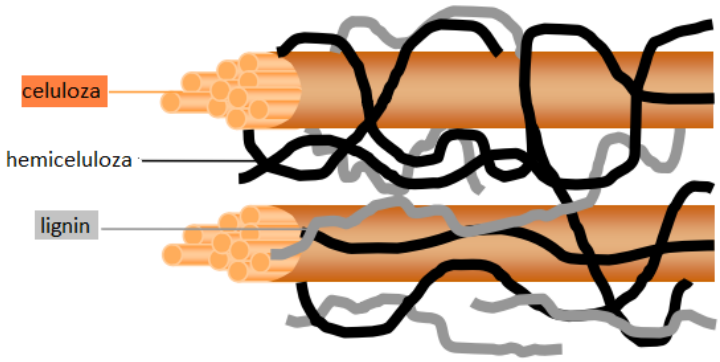


Slika 1 Ljuska manioke (AgroNature Nigeria, 2021)

2.2.2. Lignocelulozni supstrati

Ostaci iz prehrambene i poljoprivredne industrije su klasificirani kao lignocelulozna biomasa. Navedeni ostaci sadrže visoki udio polisaharida poput celuloze, hemiceluloze i lignina, ali sadrže i druge hranjive tvari poput proteina, lipida, pektina i polifenola (Ravindran i sur., 2018). U lignoceluloznim materijalima frakcije celuloze, hemiceluloze i lignina usko su povezane jedna s drugom i čine stanični kompleks biljne biomase te tvore složenu strukturu koja djeluje kao zaštitna barijera uništavanju stanica bakterijama i gljivama. Celuloza tvori kostur koji je okružen hemicelulozom i ligninom i zahvaljujući ovakvoj strukturi (**slika 2**), ove materijale karakterizira velika čvrstoća. Lignocelulozna struktura ostataka iz prehrambene i poljoprivredne industrije može se razgraditi biokatalitičkim aktivnostima različitih mikroorganizama. Da bi se odabrala najbolja metoda (mikroorganizam, vrsta uzgoja, procesni uvjeti itd.) za ponovnu upotrebu takvih ostataka, prije svega mora se poznavati kemijski sastav korištenog materijala. Lignocelulozni supstrati također zahtijevaju predobradu kako bi se razorila kompleksna struktura lignina i celuloze. Supstrati se najčešće usitnjavaju do veličine čestica 1 – 2 mm zbog razaranja stanične stijenke i povećanja površine, a ponekad se provodi i kemijska predobrada dodavanjem lužine ili kiseline (Mitchell i sur., 2002). Gljive tijekom rasta

proizvode širok spektar enzima pomoću kojih razgrađuju lignocelulozne supstrate, a to su peroksidaze i lakaze za razgradnju lignina i razne vrste glukanaza, celulaza i ksilanaza za razgradnju celuloze i hemiceluloze (Singh i sur., 2008).



Slika 2 Kompleksna struktura lignoceluloznih supstrata (Mussato i sur., 2012)

2.2.3. Supstrati koji sadrže topljive šećere

Supstrati koji sadrže visoki udio topljivih šećera uključuju slatki sirak, šećernu i krmnu repu (**slika 3**), otpatke ananasa, mahune rogača, pulpu kave i sl. (Mitchell i sur., 2002).



Slika 3 Šećerna repa i ostaci nakon prerade (Pinova d.o.o. 2021; Bocm Pauls d.o.o., 2012)

2.2.4. Trop grožđa

Trop grožđa (**slika 4**) nastaje u procesu proizvodnje vina te predstavlja lignocelulozni materijal koji se može iskoristiti za proizvodnju visokovrijednih spojeva. Sastoji se od 30 % neutralnih

polisaharida, 20 % kiselih pektinskih tvari, 15 % proantocijanidina, lignina, strukturnih proteina i fenola (Dávila i sur., 2017).



Slika 4 Trop crnog grožđa (Wine & Spirit Education Trust, 2021.)

Poznato je da je grožđe bogat izvor fenolnih spojeva koji imaju pozitivne učinke na zdravlje ljudi. Procjenjuje se da se oko 80 % godišnjeg prinosa grožđa prerađuje u vino, dok 20-30 % prerađenog grožđa ostaje kao trop grožđa. Tijekom proizvodnje vina samo 30 % fenolnih spojeva se ekstrahira u vino, a 70 % bioaktivnih fenolnih spojeva ostaje u tropu grožđa (Dwyer i sur., 2014).

Neodgovorno i neplansko odlaganje tropa grožđa u prirodi može uzrokovati višestruku štetu za okoliš. Otpuštanjem fenolnih spojeva tropa grožđa u tlo, snižava se pH tla te se tako uništava flora i fauna tla, osiromašuje tlo i sprječava razgradnja organske tvari. U konačnici dolazi do zagađenja površinskih i podzemnih voda (Bucić-Kojić i sur., 2017a).

Trop grožđa sastoji se od kožice, pulpe i sjemenki te ponekad peteljki. Kožica grožđa čini najveći udio u sastavu tropa grožđa te se zbog nedovoljno istraženog kemijskog sastava ne iskorištava njen potencijal već se koristi samo u ishrani životinja i gnojidbi tla. Ekstrakti kožice grožđa koriste se u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji kao prirodni zgušnjivači te kao prirodna bojila (Bucić-Kojić i sur., 2017a). Sastav fenolnih spojeva kožice grožđa razlikuje se ovisno o sorti i uvjetima uzgoja. Kožica sadrži najveći udio antocijanina i tanina te manju količinu galata u usporedbi s drugim dijelovima grožđa. U kožici grožđa fenolni spojevi se

nalaze u unutarnjem sloju (hipoderma) i mogu se klasificirati kao fenolni spojevi stanične stijenke koji su hidrofobnim interakcijama i vodikovim vezama vezani za polisaharide te fenolni spojevi izvan stanične stijenke, koji obuhvaćaju one u vakuolama biljnih stanica i fenolne spojeve povezane sa staničnom jezgrom (Dávila i sur., 2017).

Peteljke grožđa predstavljaju skelet grozda i dobivaju se u velikim količinama tijekom uklanjanja grožđa. One čine 3 - 6 % sirovine prerađene u vinariji. Građene su od celuloze, hemiceluloze, tanina i relativno visokog udjela lignina (Dávila i sur., 2017) te zbog takvog sastava imaju potencijal u proizvodnji visokovrijednih produkata kao što su dijetalna vlakna, polifenoli, biosorbenti i aktivni ugljen (Bucić-Kojić i sur., 2017a).

Sjemenke grožđa su bogate različitim nutrijentima koji posjeduju visoku hranjivu i zdravstvenu vrijednost. Sadrže 40 % vlakana, 16 % ulja, 11 % proteina i 7 % složenih fenolnih spojeva te druge tvari kao što su šećeri, minerali i nefenolni antioksidansi (β-karoten). Na tržištu postoje ekstrakti sjemenki grožđa koji uglavnom sadrži fenolne spojeve poput flavanola, proatocijanidina, katehina, galata itd. (Bucić-Kojić i sur., 2017a).

Zahvaljujući kemijskom sastavu (**tablica 1**), trop grožđa predstavlja visokovrijednu sirovinu, ali unatoč tome njegovo iskorištenje je neznatno, kako u Hrvatskoj, tako i u ostalim zemljama. Najčešće se upotrebljava kao gnojivo ili stočna hrana, a najveću komercijalnu vrijednost ima ulje sjemenki grožđa zbog visokog udjela bioaktivnih fenolnih spojeva (Bucić-Kojić i sur., 2017a).

Tablica 1 Kemijski sastav tropa grožđa

	Udio, $\%_{s.t.}$	**Literaturni izvor**
Lignin	23,19 – 34,1	Bender i sur., 2020; Kovalcik i sur., 2020
Celuloza	9,15 – 10,5	Bender i sur., 2020; Gowman i sur., 2020
Hemiceluloza	6,1 – 22,45	Bender i sur., 2020; Gowman i sur., 2020
Pepeo	2,3 – 7,59	Kovalcik i sur., 2020; Zhu i sur., 2015
Ukupni proteini	5,38 – 12,34	Zhu i sur., 2015
Ukupni polifenoli	4,8 – 6,7	Bucić-Kojić i sur., 2017a
Šećeri	2,7 – 49,1	Bucić-Kojić i sur., 2017a

2.3. Mikroorganizmi u fermentaciji na čvrstim nosačima

Izbor najprikladnijeg mikroorganizma ovisi o sastavu materijala koji se koristi kao supstrat te o željenom produktu fermentacije (Soccol i sur., 2017). Mikroorganizmi se mogu koristiti kao pojedinačne kulture, miješane kulture koje se mogu identificirati ili kao konzorcij mješovitih autohtonih mikroorganizama. Faktori koji utječu na rast mikroorganizama su udio vlage hranjive podloge, svojstva supstrata (kemijski sastav, veličina čestica, visina sloja supstrata), temperatura, prozračivanje, miješanje, početna koncentracija i starost mikroorganizma itd. Rast mikroorganizama obično rezultira oslobađanjem metaboličke topline. Visoke temperature mogu uzrokovati denaturaciju enzima te negativno utjecati na proizvodnju metabolita. Budući da se SSF proces odvija bez prisutnosti slobodne vode, teško je ukloniti toplinu koja se stvara tijekom rasta mikroorganizama, zbog ograničene toplinske vodljivosti čvrstog supstrata i niskog toplinskog kapaciteta zraka. Poteškoće u kontroli temperature mogu postati još izraženije kada se proces prevede u veće mjerilo (Ashok i sur., 2017; Farinas i sur., 2011).

Filamentozne gljive uključuju gotovo cijelo kraljevstvo gljiva. To su višestanične gljive i predstavljaju skupinu mikroorganizama s najvećim brojem vrsta, koji proizvode vlaknaste hife. SSF oponaša prirodna staništa filamentoznih gljiva koje zahvaljujući vlaknastim hifama rastu na površini čestica supstrata i unutar njih. Filamentozne gljive tijekom svoga rasta proizvode različite enzime te imaju veliki potencijal za proizvodnju enzima visoke komercijalne vrijednosti, kao i za brojne druge vrijedne spojeve tijekom SSF procesa (Ozcirak Ergun i Ozturk Urek, 2017; Rashad i sur., 2016).

Svaki mikroorganizam ima različit način rasta, što rezultira različitom raspodjelom biomase. Jednostanični organizmi poput kvasaca rastu u obliku biofilma, dok vlaknasti organizmi poput filamentoznih gljiva rastu u obliku micelija. Micelij gljiva se sastoji od zračnih hifa i hifa koje prodiru u materijal. Ukoliko je sloj hifa na površini gust, voda iz supstrata se može kretati kroz tanke apsorbirajuće kanaliće (kapilarnim djelovanjem), pretvarajući ovaj sloj u vlažni biofilm. Biofilm se također može stvoriti u slučaju kada se sloj miješa, jer miješanje uzrokuje istiskivanje zračnih hifa na površinu čestica materijala (Mitchell i Krieger, 2019). Bakterije se uglavnom koriste za proizvodnju enzima (proteaze, amilaze, ksilanaze, lipaze itd.) (Qureshi i sur., 2016), a kvasci za proizvodnju klorogenske kiseline, etanola, aromatskih spojeva itd. (Martínez i sur., 2017; Santos da Silveira i sur., 2019). Primjeri mikroorganizama i supstrata korištenih u SSF-u te dobivenih produkata navedeni su u **tablici 2**.

Tablica 2 Supstrati i mikroorganizmi korišteni u SSF te dobiveni produkti

Mikroorganizam	Supstrat	Produkt	Referenca
Pleurotus ostreatus	ljuska krumpira, pšenične mekinje, kora rajčice, ananasa, ljuska riže	lignolitički enzimi, ksilanaze, proteaze, bioaktivni polifenoli, antioksidansi	Elisashvili i sur., 2009; Iandolo i sur., 2011; Ozcirak Ergun i Ozturk Urek, 2017; Rashad i sur., 2016
Bjerkandera adusta	pšenične mekinje	karboksimetil celulaze, mangan peroksidaze, lakaze, ksilanaze	Elisashvili i sur., 2009
Trametes hirsuta	sjemenke grožđa	lakaze	Rodríguez Couto i sur., 2006

Trametes versicolor	tomato pomace, kukuruzna silaža	lakaze, ksilanaze, proteaze	Bucić-Kojić i sur., 2017b; Iandolo i sur., 2011
Phanerochaete chrysosporium	jabučni trop	phenolic antioxidants	Ajila i sur., 2015
Saccharomyces cerevisiae	trop grožđa	etanol	Rodríguez i sur., 2010

2.3.1. Gljive bijelog truljenja

Gljive bijelog truljenja (eng. white-rot fungi) predstavljaju raznoliku skupinu gljiva koje pretežno pripadaju skupinama *Basidiomycetes* i *Ascomycetes* u carstvu gljiva. Prisutne su u prirodi, posebno u šumama gdje prevladava drveće poput breze i vrbe. Poznate su po tome da mogu razgraditi sve komponente drveta (celulozu, hemicelulozu i lignin). Naziv su dobile po tome što nakon razgradnje lignina drvni materijal poprima bijelu boju. Tijekom sekundarnog metabolizma ove gljive izlučuju izvanstanične enzimske komplekse. Uglavnom su to lakaze, mangan peroksidaze, lignin peroksidaze te drugi enzimi (Mir-Tutusaus i sur., 2018; Rodríguez-Couto, 2017). Nespecifičnost ovih enzima omogućuje im transformiranje velikog broja spojeva koji su dio lignocelulozne strukture. Zahvaljujući ovim karakteristikama, gljive bijelog truljenja mogu imati različite industrijske i biotehnološke primjene, poput proizvodnje biogoriva iz biljne biomase, biopulpiranja, bioizbjeljivanja i razgradnje različitih zagađivača okoliša (Rodríguez-Couto, 2017).

Tijekom rasta gljiva i izlučivanja enzima dolazi do reakcija oksidacije i do cijepanja metoksi, fenolnih i alifatskih skupina lignina, te do cijepanja aromatskih prstena i tvorbe novih karbonilnih skupina (Madadi i Abbas, 2017). Prema tipu razgradnje lignoceluloznog materijala, gljive bijelog truljenja dijele se na one koje razgrađuju lignin i hemicelulozu (selektivni tip razgradnje). Ove vrste su od posebnog bioindustrijskog interesa jer razgrađuju lignin, ostavljajući vrijednu celulozu netaknutom, primjerice *Ceriporiopsis subvermispora* i *Dichomitus squalens*. Drugi tip razgradnje je simultana ili neselektivna razgradnja koja uključuje razgradnju svih komponenti lignoceluloznog materijala, primjerice *T. versicolor* i *Fomes fomentarius* (Madadi i Abbas, 2017; Rodríguez-Couto, 2017).

Smatraju se organizmima koji mogu podnijeti teške uvjete pri kojima njihov kompleksni enzimski sustav može funkcionirati te ih njihova otpornost štiti od visokih koncentracija organskih zagađivača i teških metala (Huang i sur., 2018; Okal i sur., 2020).

2.3.2. *Phanerochaete chrysosporium*

P. chrysosporium je filamentozna gljiva koja pripada gljivama bijelog truljenja, razredu *Basidiomycetes* (**slika 5**). Jedna je od najviše proučavanih gljiva bijelog truljenja, koja tijekom sekundarnog metabolizma proizvodi izvanstanične enzime zadužene za razgradnju lignocelulozne strukture. Ovi enzimi najčešće uključuju peroksidaze poput mangan peroksidaza i lignin peroksidaza te oksidaze poput lakaza (Huang i sur., 2017; Sosa-Martínez i sur., 2020). Zbog svoje unutarstanične hiperakumulacijske sposobnosti može uklanjati organska onečišćenja i zagađenja teških metala. Brojna istraživanja su pokazala da je ovaj mikroorganizam učinkovit u razgradnji ksenobiotika te u obradi otpadnih voda koje sadrže toksične organske tvari i teške metale (Hu i sur., 2017; Huang i sur., 2018). Tijekom sekundarnog metabolizma *P. chrysosporium* može razgraditi razne organske spojeve i proizvesti različite komponente (Singh i Chen, 2008).

Zbog svojih lignolitičkih svojstava, brzog rasta i jednostavnog rukovanja s kulturom često se koristi u laboratorijskim istraživanjima metaboličkih puteva razgradnje lignina (Costa i sur., 2017). Može tolerirati širok raspon temperatura (od 20 °C do 40 °C) i ograničenja hranjivih tvari, a optimalna temperatura za rast je 35 °C (Whiteford i sur., 2021; Zeng i sur., 2015).



Slika 5 *P. chrysosporium* (Franjo, 2009)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Cilj i zadatak rada

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj biološke obrade tropa grožđa na sastav fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost u ekstraktima tropa grožđa prije i nakon biološke obrade. Biološka obrada tropa grožđa provedena je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, pomoću gljive bijelog truljenja *P. chrysosporium*.

Zadatak rada je bio tijekom 8 dana biološke obrade pratiti i odrediti gubitak na masi supstrata (tropa grožđa) te udjele/koncentracije: vlage, proteina, ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i proantocijanidina te antioksidacijsku aktivnost ekstrakata tropa grožđa dobivenih kruto-tekućom ekstrakcijom u vodenoj kupelji.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Mikroorganizam

Kao radni mikroorganizam korištena je gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium* koja je uzgajana na krumpirovom agaru (PDA) tijekom sedam dana pri 27 °C (**slika 6**).



Slika 6 *P. chrysosporium* na krumpirovom agaru

3.2.2. Supstrat

Supstrat, trop grožđa sorte *cabernet sauvignon* porijekom je iz vinarije Erdut, berba 2019. Trop grožđa je skladišten je pri -20 °C te je za potrebe provedbe eksperimenata odmrzavan na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata.

3.2.3. Kemikalije

Tijekom provedbe eksperimentalonog dijela rada korištene su sljedeće kemikalije: krumpirov agar (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italija), BSA otopina – goveđi serumski albumin (Acros Organics, New Yersey, SAD), apsolutni etanol (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), metanol ultra gradient grade (J.T. Baker, Arnhem, Nizozemska), acetonitril HPLC čistoće (Fisher Chemical, Loughborough, UK), ledena octena kiselina (Macron Fine Chemicals, Gliwice, Poljska), DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), katehin, epikatehin, gallokatehin galat, epikatehin galat, galna kiselina, elaginska kiselina, siringinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) i vanilinska kiselina (Acros Organics, Geel, Belgija).

3.2.4. Uređaji

Autoklav

Sterilizacija laboratorijskog posuđa, korištenih otopina i supstrata prije i nakon biološke obrade provedena je u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd) pri 121 °C, tijekom 20 minuta.

pH metar

Mjerenje pH vrijednosti ekstrakata tropa grožđa prije i nakon biološke obrade provedeno je pomoću pH metra pH/ORP HI 2211 (Hanna Instruments).

Inkubator

SSF proces se provodio u laboratorijskim staklenkama smještenim u inkubatoru pri 27 °C, tijekom 8 dana (Binder, Njemačka) (**Slika 7**).



Slika 7 Inkubator (Katalog opreme, 2019.)

Mlin

Nakon biološke obrade i sušenja, uzorci su samljeveni u ultracentrifugalnom mlinu (ZM 200, Retsch, Njemačka) na veličinu čestica od 1 mm (**slika 8**).



Slika 8 Mlin (Katalog opreme, 2019.)

Analizator vlage

Udio suhe tvari u uzorcima određivan je svakog dana tijekom i nakon SSF procesa brzom termogravimetrijskom metodom pomoću uređaja za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo, Švicarska) (**slika 9**).



Slika 9 Uređaj za mjerenje suhe tvari

Vodena kupelj

Vodena kupelj s tresilicom (Julabo SW-23, Njemačka) (**Slika 10**) koristila se za ekstrakciju tijekom 120 minuta, pri 80 °C i 200 rpm.



Slika 10 Vodena kupelj (Katalog opreme, 2019.)

Centrifuga

Za provedbu analiza korišten je supernatant dobiven nakon centrifugiranja tijekom 10 minuta pri 10 000*g* na centrifugi Hermle Z 326K (Njemačka) (**slika 11**).



Slika 11 Centrifuga

Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC)

Identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih fenolnih spojeva provedena je pomoću UHPLC-a Nexera XR, Shimadzu (**slika 12**), a podaci su obrađeni pomoću softvera LabSolution (verzija 5.71 SP2).



Slika 12 UHPLC (Katalog opreme, 2019.)

Spektrofotometar

Spektrofotometar (UV-1280 Shimadzu, Japan) korišten je za mjerenje ukupnih polifenola, flavonoida, proteina, proantocijanidina i antioksidacijske aktivnosti (**slika 13**).



Slika 13 Spektrofotometar

3.2.5. Uzgoj i čuvanje kulture

Kultura je uzgajana na PDA agaru na način da je izvagano 21 g agara i otopljeno u 500 cm^3 destilirane vode uz zagrijavanje. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri 121 ˚C, tijekom 15 min. Nakon što se malo ohladila, dobro je promiješana te razlivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nacjepljivanje mikroorganizma provedeno je prenošenjem micelijskog diska promjera 0,6 cm na sterilnu ohlađenu podlogu. Inkubacija je trajala sedam dana pri 27 °C.

3.2.6. Priprema uzorka za SSF

Trop grožđa je odmrznut i osušen pri sobnoj temperaturi tijekom 24 sata, te grubo usitnjen na blenderu (HR 2860, Philips). Odvagano je 50 g supstrata (trop grožđa) u laboratorijske staklenke te je dodano 30 cm^3 destilirane vode. Sadržaj je dobro promiješan te su staklenke sterilizirane pri 121 °C tijekom 15 min, a potom ostavljene da se ohlade na sobnu temperaturu. U staklenke sa supstratom dodano je 10 cm^3 suspenzije spora *P. chrysosporium* pripremljene dodatkom 5 micelijskih diskova (promjera 1 cm) u 10 cm^3 sterilizirane vode. Staklenke su prekrivene papirom propusnim za zrak i stavljene na inkubaciju tijekom 8 dana pri 27 °C i ventilacijom podešenom na 20 %.

3.2.7. Obrada uzoraka nakon provedene fermentacije

Nakon svakog dana fermentacije iz inkubatora su uzimane staklenke koje su potom izvagane kako bi se pratio gubitak na masi, te sterilizirane kako bi se zaustavio rast mikroorganizma i sam proces SSF. Na **slici 14** prikazane su staklenke nakon trećeg dana fermentacije. Nakon sterilizacije uzorci su sušeni na sobnoj temperaturi tijekom 48 sati, nakon čega su samljeveni i korišteni za ekstrakciju. Eksperiment je proveden u tri paralele za svaki dan fermentacije.



Slika 14 Staklenke nakon trećeg dana fermentacije

3.2.8. Priprema ekstrakata za analize

1 g samljevenog uzorka tropa grožđa ekstrahiran je s 40 cm^3 50 %-tnog etanola u vodenoj kupelji s tresilicom (SW-23, Julabo) tijekom 120 minuta pri 80 °C i 200 rpm. Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani (Z 326 K, Hermle) tijekom 10 minuta, pri 10000 *g* te je odvojen supernatant koji je korišten za analize.

3.2.9. Priprema ekstrakata za mjerenje pH vrijednosti

Ekstrakti za mjerenje pH vrijednosti pripremljeni su na način da je u 2 g samljevenog uzorka tropa grožđa dodano 10 cm^3 destilirane vode, promiješano na vorteksu (DLab MX-S) tijekom 15 sekundi, stajalo 5 minuta te ponovo promiješano na vorteksu 15 sekundi. Nakon toga su uzorci centrifugirani pri 10000 *g* tijekom 5 minuta te je odvojen supernatant koji je korišten za mjerenje pH vrijednosti.

3.3. Analitičke metode

3.3.1. Određivanje koncentracije pojedinačnih polifenola UHPLC metodom

Prije analiziranje ekstrakata na UHPLC-u, ekstrakti su profiltrirani na mikrofilteru (45 µm) u vijalice iz kojih je ekstrakt uzorkovan tijekom UHPLC analize. Analiza je provedena prema prethodno objavljenoj metodi (Bucić-Kojić i sur., 2017b). Razdvajanje pikova je provedeno korištenjem reverzno-fazne kolone Kinetex®C18 (100 × 4,6 mm, 2,6 µm; Phenomenex). Detekcija spojeva provedena je pomoću PDA detektora pri valnim duljinama od 190 do 350 nm, a određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva je provedeno usporedbom retencijskog vremena i spektralnih podataka nakon injektiranja otopine standarda pri istim uvjetima analize. Polifenolni spojevi su kvantificirani pomoću kalibracijskih krivulja za svaki pojedini spoj. Podaci su prikupljeni i analizirani u programu Lab-Solutions (verzija 5.71 SP2). Uzorci su analizirani u tri paralele.

3.3.2. Određivanje ukupnih polifenola Folin-Ciocalteu metodom

Folin-Ciocalteu (FC) metoda je kolorimetrijska metoda koja se temelji na oksidacijskim i redukcijskim reakcijama. FC reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdenove kiseline. U alkalnom mediju uz prisustvo FC reagensa, polifenoli se oksidiraju, a navedene kiseline reduciraju u wolframov i molibdenov oksid (plavo obojeni) te se njihova apsorbancija mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm (Kuzmanović, 2014).

Postupak izrade kalibracijske krivulje

Baždarna krivulja je napravljena sa standardom galne kiseline, otapanjem 0,5 g galne kiseline s 10 cm^3 96 %-tne otopine etanola te nadopunjavanjem destiliranom vodom do oznake u odmjerenoj tikvici od 100 cm^3. Nakon toga pripremljena su različita razrjeđenja (0,05 - 1,0 mg/cm^3) na način da je u odmjerene tikvice od 50 cm^3 dodano po 0,5 cm^3; 1,0 cm^3; 1,5 cm^3; 2,5 cm^3; 5,0 cm^3; 7,5 cm^3 i 10 cm^3 otopine galne kiseline, te nadopunjeno do oznake destiliranom vodom. Prema postupku za određivanje ukupnih polifenola u ekstraktima, izmjerena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine galne kiseline, te je iz dobivenih rezultata izrađena kalibracijska krivulja.

Postupak određivanja ukupnih polifenola

U epruvetu je otpipetirano 40 mm^3 pripremljenog ekstrakta tropa grožđa, 3160 mm^3 destilirane vode i 200 mm^3 FC reagensa. Nakon stajanja od 30 sekundi i 8 minuta u epruvetu je dodano 600 mm^3 20 %-tne vodene otopine Na_2CO_3. Slijepa proba pripremana je na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodavao jednaki volumen (40 mm^3) destilirane vode. Svi uzorci su promiješani na vorteksu (DLab MX-S) i ostavljeni u vodenoj kupelji 30 minuta pri 40 °C. Tijekom inkubacije razvijena je boja čija je apsorbancija mjerena na UV/VIS spektrofotometru (UV-1280, Shimadzu) pri valnoj duljini od 765 nm. Iz dobivenih apsorbancija izračunate su koncentracije ukupnih polifenola preko kalibracijske krivulje i izražene u ekvivalentima galne kiseline odnosno u $mg_{GAE}/cm^3_{ekstrakta}$ te preračunate su na suhu tvar uzorka ($mg_{GAE}/g_{s.t.}$). Određivanje ukupnih polifenola provedeno je u tri ponavljanja.

3.3.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida provedeno je spektrofotometrijskom metodom uz pomoć aluminijevog klorida.

Postupak određivanja ukupnih flavonoida

U 4 cm^3 destilirane vode dodano je 1 cm^3 ekstrakta biološki obrađenog tropa grožđa, a potom 0,3 cm^3 5 % natrijevog nitrita ($NaNO_2$) (otopiti 5 g u 100 cm^3) te je nakon pet minuta dodano 0,3 cm^3 10 %-tne vodene otopine aluminij (III)-klorida heksahidrata (otopiti 10 g u 100 cm^3). Nakon 5 - 8 minuta dodano je 2 cm^3 1 M natrijevog hidroksida (NaOH) te je reakcijska smjesa nadopunjena destiliranom vodom do 10 cm^3. Slijepa proba pripremana je na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodavao jednak volumen (1 cm^3) destilirane vode. Svi uzorci su promiješani na vorteksu te je odmah izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 510 nm. Koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktima tropa grožđa određena je u odnosu na standardnu krivulju (+)-katehina (CE) te preračunata na suhu tvar uzorka ($mg_{CE}/g_{s.t.}$). Uzorci su analizirani u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti.

3.3.4. Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom

Bradfordičina metoda temelji se na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brillant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, pri čemu dolazi do stvaranja kompleksa protein-boja, koji u kiselom mediju pokazuje maksimum apsorbancije pri 595 nm (Strelec i Kovač, 2014).

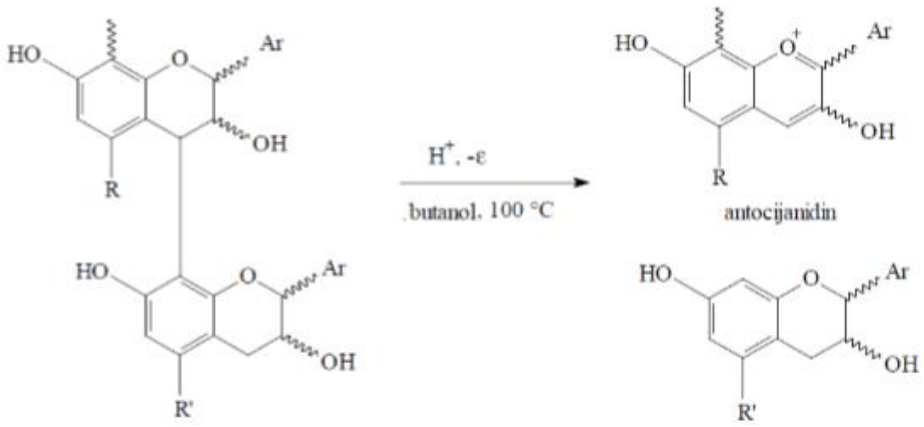
U kivete je dodano 100 mm^3 ekstrakta tropa grožđa i 2 cm^3 svježe pripremljenog Bradfordičinog reagensa (razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:4) te je reakcijska smjesa ostavljena stajati na sobnoj temperaturi točno 5 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 595 nm. Koncentracija proteina u ekstraktima tropa grožđa određena je u odnosu na standardnu krivulju BSA (goveđi serum albumin) te preračunata na suhu tvar uzorka ($mg_{BSA}/g_{s.t.}$). Uzorci su analizirani u dva ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti.

3.3.5. Određivanje ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina

Ukupni ekstraktibilni proantocijanidini u ekstraktima tropa grožđa određeni su spektrofotometrijskom metodom baziranoj na njihovoj reakciji s otopinom kiselina-butanol (**slika 15**).

Princip

U kiselom mediju proantocijanidini se depolimeriziraju u butanolu uz nastajanje crveno obojenih antocijanidina koji se mogu detektirati spektrofotometrijski.



Slika 15 Depolimerizacija proantocijanidina u kiselom mediju (Schofield i sur., 2001)

Postupak

U 2 cm^3 pripremljenog ekstrakta za analizu dodano je 20 cm^3 otopine željezo(II)-sulfat-heptahidrata (pripremljena je otapanjem 77 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ u 500 cm^3 otopine kloridne kiseline : 1-butanol pomiješane u omjeru 2:3). Slijepa proba pripremljena je na isti način kao i uzorci, ali je umjesto uzorka dodavan jednak volumen (2 cm^3) destilirane vode. Nakon inkubacije uzoraka 15 minuta pri 95 °C u vodenoj kupelji, uzorci su naglo ohlađeni i odmah analizirani mjerenjem apsorbancija na valnoj duljini od 540 nm. Za svaki uzorak rađena su tri paralelna ponavljanja. Iz dobivenih apsorbancija, masena koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina β_{UPA} [g/dm^3] izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$c_{UPA} = \frac{A \cdot M \cdot DF}{\varepsilon \cdot l}$$

gdje je: A – apsorbancija, M – molarna masa cijanida (M = 287 g/mol), DF - faktor razrijeđenja (DF = 11; omjer ukupnog volumena reakcijske smjese za određivanje UPA (22 cm^3) i volumena ekstrakta (2 cm^3)), koeficijent molarne ekstinkcije cijanidina (ε = 34700 $dm^3/mol \cdot cm$), l - duljina optičkog puta (1 cm).

Konačne koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima preračunate su na suhu tvar tropa grožđa [$mg/g_{s.t.}$] uzimajući u obzir razrjeđenje ekstrakta (Kuzmanović, 2014).

3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ABTS metodom

ABTS metoda (TEAC metoda) se temelji na sposobnosti antiokisdanasa da reduciraju $ABTS^{\bullet+}$ radikalski kation što se očituje u smanjenju plavo zelene boje radikal kationa pri mjerenju apsorbancije na 734 nm. Brzina obezbojenja ($ABTS^{\bullet+}$) otopine ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti uzorka, koncentraciji antioksidanasa i trajanju reakcije. Stupanj obezbojenja otopine ABTS+ radikalskog kationa, određen je kao funkcija koncentracije i vremena i izračunat u odnosu na reaktivnost Troloxa kao standarda, pod istim uvjetima. Promjena boje mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 734 nm (Re et al., 1999).

Za pripremu baždarne krivulje korištene su koncentracije Troloxa od 25 do 900 µM pripremljenog u etanolu ili destiliranoj vodi iz stock otopine Troloxa (2,5 mM) pripremljenog u etanolu (Re et al., 1999).

Stock otopina 7 mM ABTS-a pripremljena je otapanjem 96,02 mg ABTS soli u 25 cm^3 destilirane vode, a stock otopina 2,45 mM amonij persulfata otapanjem 4,9 mg u 25 cm^3 destilirane vode. ABTS radikalski kation ($ABTS^{\bullet+}$) proizveden je reakcijom stock otopine ABTS-a s 2,45 mM amonij persulfatom koje se pomiješaju u jednakim omjerima pri čemu nastaje $ABTS^{\bullet+}$ radikal što se očituje nastankom zeleno-plavog obojenja. Kako bi se postigao završetak reakcije, otopina se ostavlja u mraku, pri sobnoj temperaturi, 12 do 16 sati prije upotrebe. Na dan provođenja analiza otopina se razrjeđuje s etanolom ili destiliranom vodom tako da apsorbancija konačne otopine iznosi oko 0,706 pri valnoj duljini od 734 nm (Re et al.,1999).

Za slijepu probu koristi se apsolutni etanol. Za kontrolni uzorak koristi se 950 mm^3 otopine $ABTS^{\bullet+}$ radikala i 50 mm^3 apsolutnog etanola te se očita apsorbancija nakon 10 min inkubacije na tamnom mjestu pri 734 nm (Hodak, 2019). Za analizu uzoraka pomiješa se 950 mm^3 otopine otopine $ABTS^{\bullet+}$ radikala i 50 mm^3 ekstrakata, zatim se promiješa i očita apsorbancija nakon 10 min inkubacije na tamnom mjestu pri 734 nm. Sva mjerenja provedena su u tri paralele.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Biološka obrada tropa grožđa provedena je s filamentoznom gljivom *P. chrysosporium* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima tijekom 8 dana pri 27 °C. Biološka obrada provedena je s pretpostavkom da *P. chrysosporium* tijekom rasta na tropu grožđa proizvodi kompleksni enzimski sustav te na taj način razgrađuje složenu lignocelulozu strukturu pri čemu dolazi do oslobađanja jednostavnijih fenolnih spojeva, koji su tada lakše dostupni za ekstrakciju.

Početni udio vlage supstrata podešen je na 67 % budući da je optimalni udio vlage za rast filamentoznih gljiva u uvjetima SSF od 60 do 80 %.

Početni uzorak tropa grožđa te biološki obrađeni uzorci pripremani su na isti način za potrebe analiziranja gubitka na masi supstrata, udjela/koncentracije: vlage, proteina, ukupnih i pojedinačnih polifenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i proantocijanidina te antioksidacijske aktivnosti. Priprema uzoraka je uključivala sterilizaciju, sušenje, mljevenje, ekstrakciju, centrifugiranje i odvajanje supernatanta. Biološka obrada provedena je u laboratorijskim staklenkama u tri paralele za svaki dan fermentacije te su sve vrijednosti prikazane kao srednje vrijednosti. Rezultati biološke obrade uspoređivani su s početnim uzorkom koji nije bio biološki obrađen („nulti dan“).

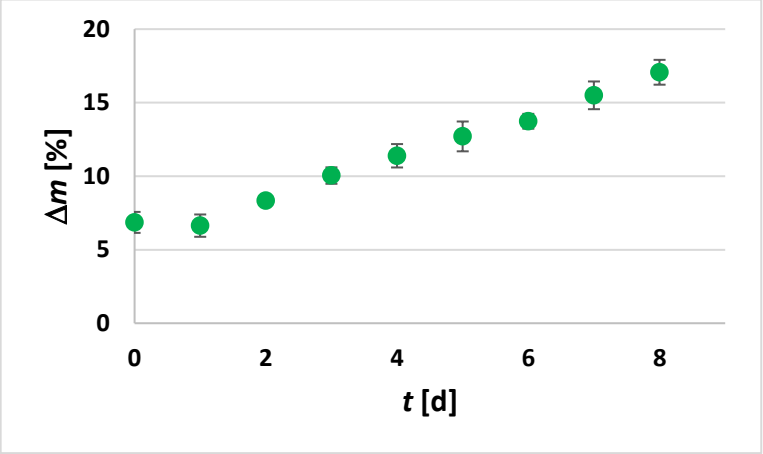
Udio suhe tvari u biološki neobrađenom i biološki obrađenim uzorcima tropa grožđa određen je nakon sterilizacije uzoraka, te hlađenja i sušenja uzoraka tijekom 48 h pri sobnoj temperaturi. Udio suhe tvari u biološki neobrađenom tropu grožđa kretao se u rasponu od 94,31 % do 94,64 %, dok se u biološki obrađenom tropu grožđa kretao u rasponu od 93,65 % do 95,28 %.

Nakon provedenih istraživanja i eksperimentalno dobivenih podataka, obrađeni rezultati prikazani su u dijagramima. Obrada podataka provedena je u Microsoft Excel programu.

4.1. Gubitak na masi uzorka

Tijekom provedbe SSF procesa praćen je i određen gubitak mase supstrata tijekom svakog dana fermentacije. **Slika 16** prikazuje ovisnost gubitka mase supstrata o vremenu SSF-a, gdje je vidljivo da se s vremenom fermentacije povećao gubitak na masi. Gubitak mase supstrata tijekom 8 dana fermentacije iznosio je 17,07 %. Dobiveni rezultati pokazuju da *P.*

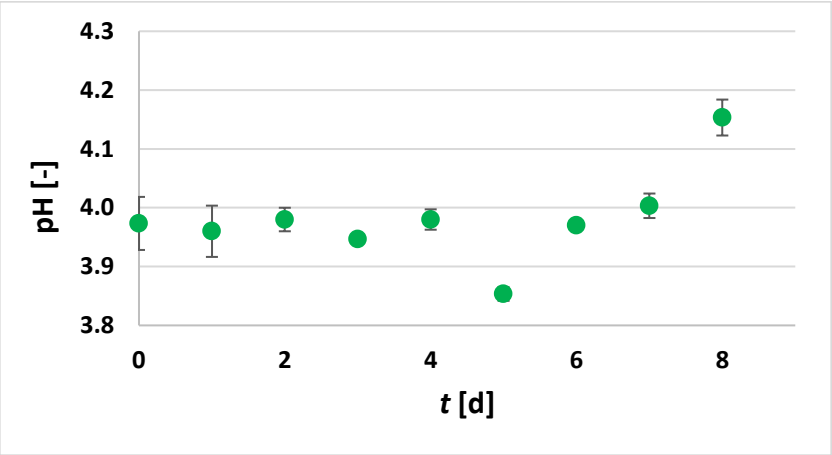
chrysosporium tijekom svog rasta koristi hranjive tvari iz supstrata uslijed čega dolazi do gubitka na masi te se ovaj mikroorganizam osim za proizvodnju visokovrijednih produkata može koristiti i za razgradnju supstrata i smanjenje količine otpada.



Slika 16 Ovisnost gubitka mase supstrata (Δm) tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade (t)

4.2. pH vrijednost

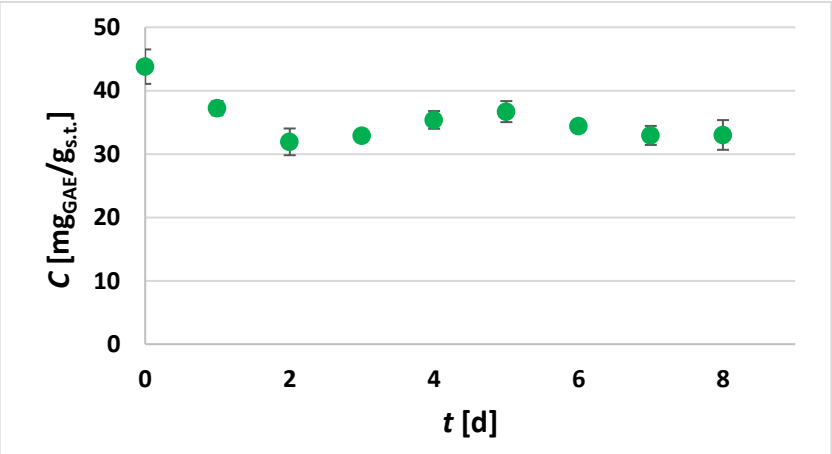
Slika 17 prikazuje ovisnost pH vrijednosti tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade. Rezultati su pokazali da biološka obrada tropa grožđa pomoću *P. chrysosporium* može utjecati na povećanje pH vrijednosti. Vrijednost pH u početnom uzorku tropa grožđa bila je 3,97, a u uzorku nakon 8 dana biološke obrade 4,15. Moguće je da bi do značajnijeg porasta pH vrijednosti došlo nakon duže provedbe SSF-a. Budući da trop grožđa ima nižu pH vrijednost, SSF tehnologija ima potencijal kao metoda predobrade tropa grožđa s ciljem povećanja pH vrijednosti te povećanja udjela važnih komponenti poput proteina i mineralnih tvari u svrhu njegove primjene kao biognojiva.



Slika 17 Ovisnost pH vrijednosti tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade (*t*)

4.3. Ukupni polifenolni spojevi

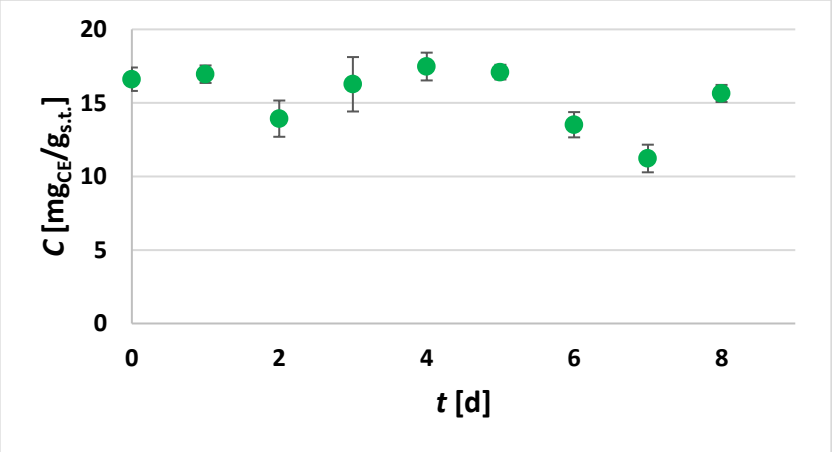
Slika 18 prikazuje ovisnost masenog udjela ukupnih polifenolnih spojeva tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade. Rezultati su pokazali da biološki neobrađeni uzorak tropa grožđa sadrži najveći maseni udio ukupnih polifenolnih spojeva (43,79 $mg_{GAE}/g_{s.t.}$). Tijekom prvog i drugog dana biološke obrade došlo je do pada masenog udjela ukupnih polifenolnih spojeva (31,92 $mg_{GAE}/g_{s.t.}$), nakon čega je udio počeo rasti sve do petog dana (36,69 $mg_{GAE}/g_{s.t.}$) te opet padati do osmog dana biološke obrade (33,01 $mg_{GAE}/g_{s.t.}$).



Slika 18 Ovisnost masenog udjela ukupnih polifenolnih spojeva tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade (*t*)

4.4. Ukupni flavonoidi

Slika 19 prikazuje ovisnost masenog udjela ukupnih flavonoida tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade. Rezultati su pokazali da biološki neobrađeni uzorak tropa grožđa sadrži maseni udio ukupnih flavonoida od 16,61 $mg_{CE}/g_{s.t.}$, a biološkom obradom je došlo do blagog porasta masenog udjela nakon prvog, četvrtog i petog dana kada je maseni udio ukupnih flavonoida iznosio 16,95 $mg_{CE}/g_{s.t.}$, 17,47 $mg_{CE}/g_{s.t.}$ i 17,09 $mg_{CE}/g_{s.t.}$.

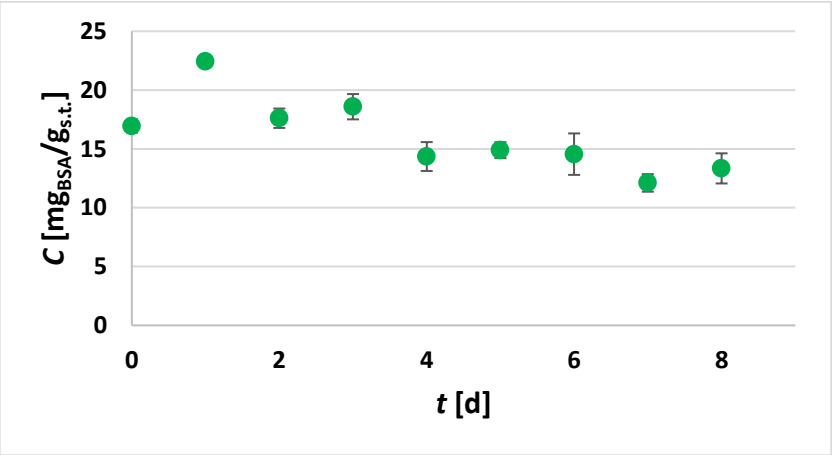


Slika 19 Ovisnost masenog udjela ukupnih flavonoida tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade (*t*)

4.5. Proteini

Slika 20 prikazuje ovisnost masenog udjela proteina tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade. Dobiveni rezultati su pokazali da je nakon prvog dana biološke obrade došlo do porasta masenog udjela proteina (22,44 $mg_{BSA}/g_{s.t.}$) u odnosu na početni biološki neobrađeni uzorak tropa grožđa (16,95 $mg_{BSA}/g_{s.t.}$). Od drugog do osmog dana biološke obrade maseni udio proteina se smanjivao pri čemu je osmi dan fermentacije iznosio 13,34 $mg_{BSA}/g_{s.t.}$.

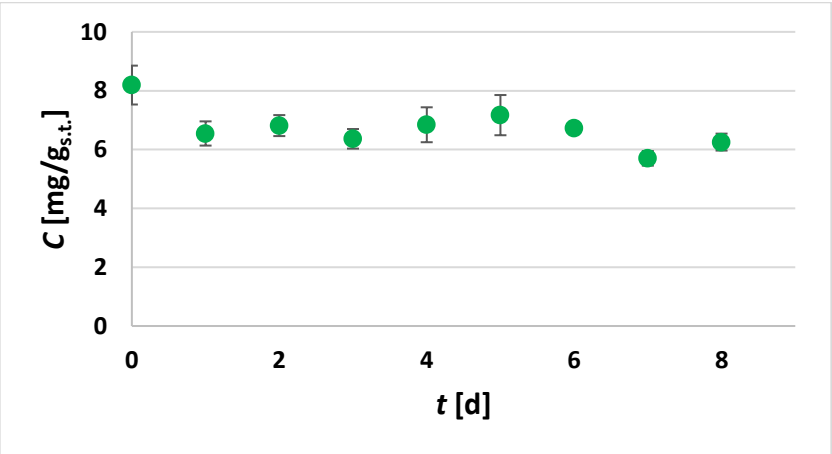
Fraser (2005.) u svom radu navodi kako *P. chrysosporium* nakon što osigura dovoljnu količinu primarnih metabolita neophodnih za rast i razvoj, prelazi u fazu sekundarnog metabolizma u kojoj se sintetiziraju sekundarni metaboliti koji nisu izravno uključeni u rast, razvoj i razmnožavanje. *P. chrysosporium* tijekom sekundarnog metabolizma sintetizira kiselinske proteaze odgovorne za razgradnju proteina.



Slika 20 Ovisnost masenog udjela proteina tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade (*t*)

4.6. Ukupni ekstraktibilni proantocijanidini

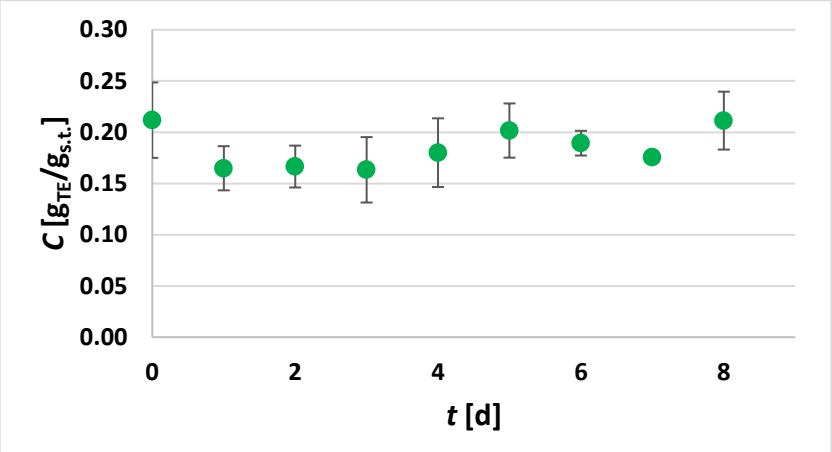
Slika 21 prikazuje ovisnost masenog udjela proantocijanidina tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade. Dobiveni rezultati su pokazali da biološki neobrađeni uzorak tropa grožđa sadrži najveći maseni udio proantocijanidina (8,19 mg/$g_{s.t.}$). Tijekom biološke obrade maseni udio proantocijanidina se malo smanjio u odnosu na početni uzorak, a najveća vrijednost izmjerena je 5. dan biološke obrade (7,17 mg/$g_{s.t.}$).



Slika 21 Ovisnost masenog udjela proantocijanidina tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade (*t*)

4.7. Antioksidacijska aktivnost

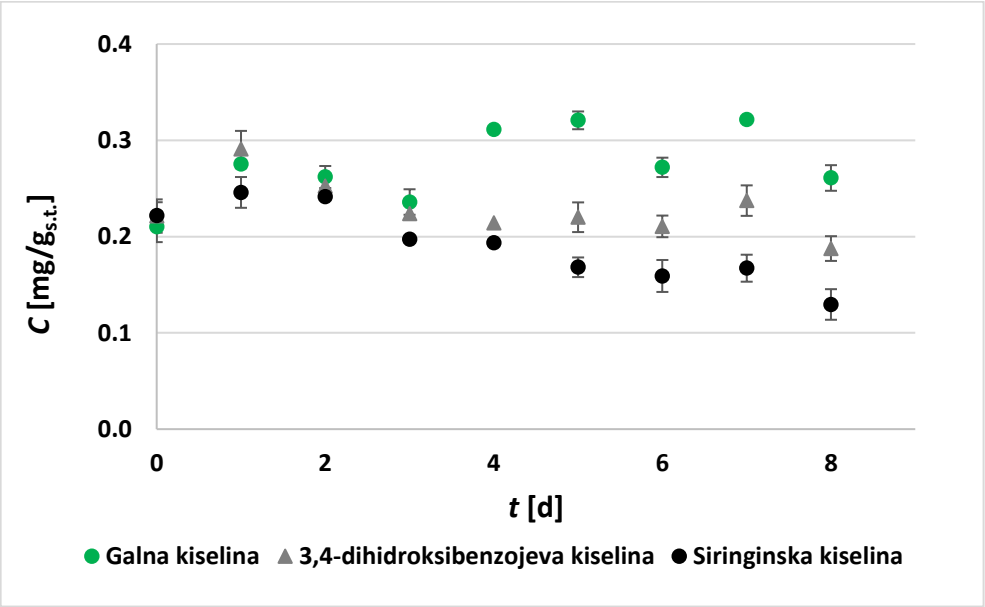
Slika 22 prikazuje ovisnost antioksidacijske aktivnosti tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade. Rezultati su pokazali da je u ekstraktima početnog biološki neobrađenog tropa grožđa iznosila 0,21 $g_{TE}/g_{s.t.}$, kao i osmi dan fermentacije. Tijekom biološke obrade antioksidacijska aktivnost nije se značajno mijenjala.



Slika 22 Ovisnost antioksidacijske aktivnosti tijekom biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* o trajanju biološke obrade (*t*)

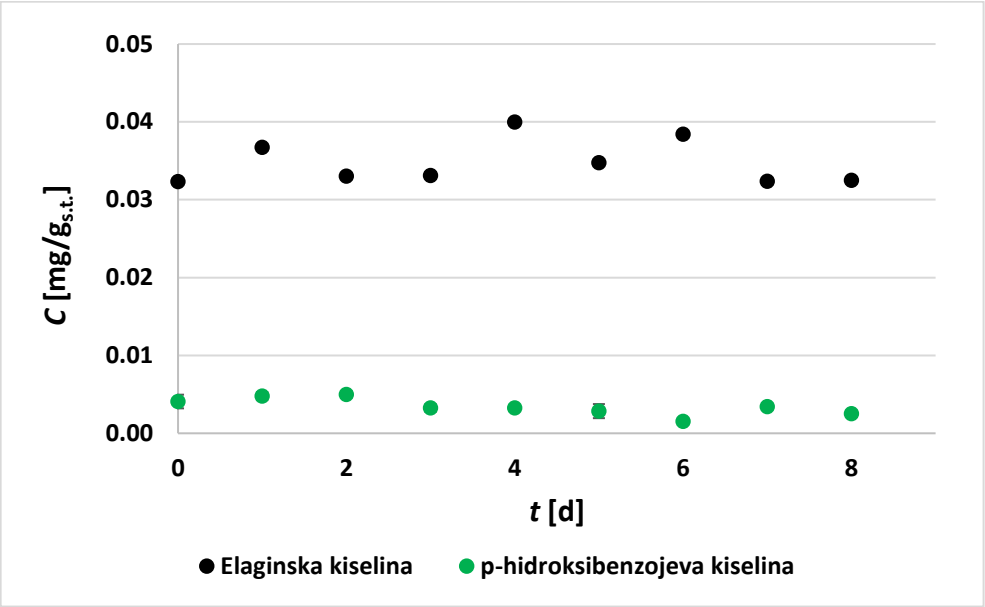
4.8. Pojedinačni polifenolni spojevi

Slika 23 prikazuje srednje vrijednosti masenog udjela galne kiseline, 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline i siringinske kiseline (*C*) u ekstraktima početnog i biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (*t*). Maseni udio galne kiseline postepeno je rastao tijekom biološke obrade, a sedmi dan je dosegnuo maksimalnu vrijednost od 0,32 $mg/g_{s.t.}$. Maseni udio 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline je porastao nakon prvog dana biološke obrade (0,29 $mg/g_{s.t.}$) u odnosu na početni biološki neobrađeni uzorak tropa grožđa (0,22 $mg/g_{s.t.}$), nakon čega je počeo opadati sve do osmog dana fermentacije. Maseni udio siringinske kiseline je porastao nakon prvog (0,25 $mg/g_{s.t.}$) i drugog dana (0,24 $mg/g_{s.t.}$) biološke obrade, nakon čega je opadao sve do osmog dana fermentacije.



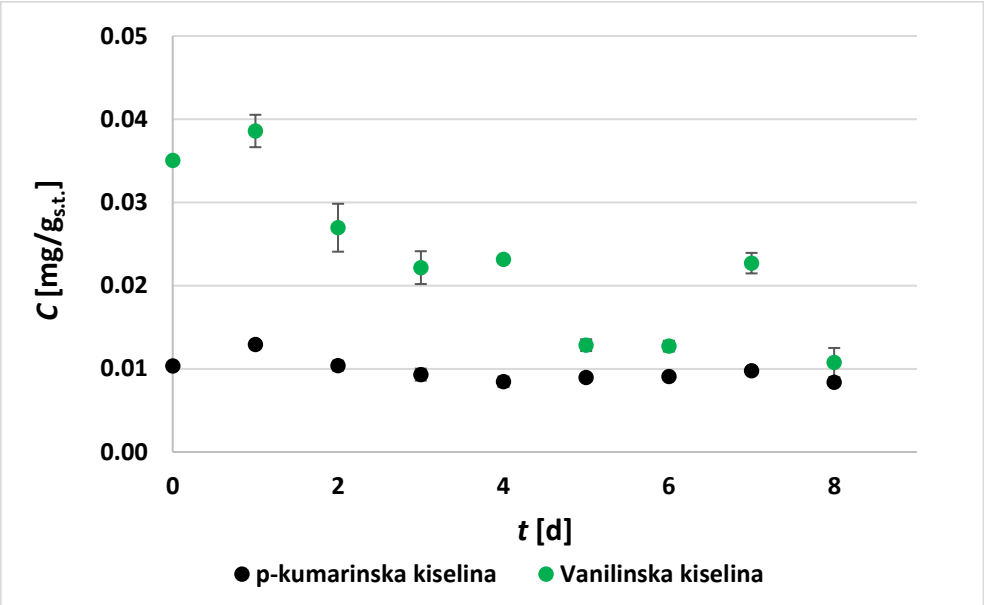
Slika 23 Srednje vrijednosti masenog udjela galne kiseline, 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline i siringinske kiseline (*C*) u ekstraktima početnog i biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (*t*)

Slika 24 prikazuje srednje vrijednosti masenog udjela elaginske kiseline i *p*-hidroksibenzojeve kiseline (*C*) u ekstraktima početnog i biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (*t*). Maseni udio elaginske kiseline i *p*-hidroksibenzojeve kiseline nije se značajno mijenjao tijekom biološke obrade tropa grožđa. U slučaju elaginske kiseline maksimalna vrijednost masenog udjela izmjerena je nakon četvrtog dana biološke obrade i iznosila je 0,040 mg/$g_{s.t.}$, a u slučaju *p*-hidroksibenzojeve maksimalna vrijednost masenog udjela izmjerena je nakon drugog dana biološke obrade i iznosila je 0,005 mg/$g_{s.t.}$.



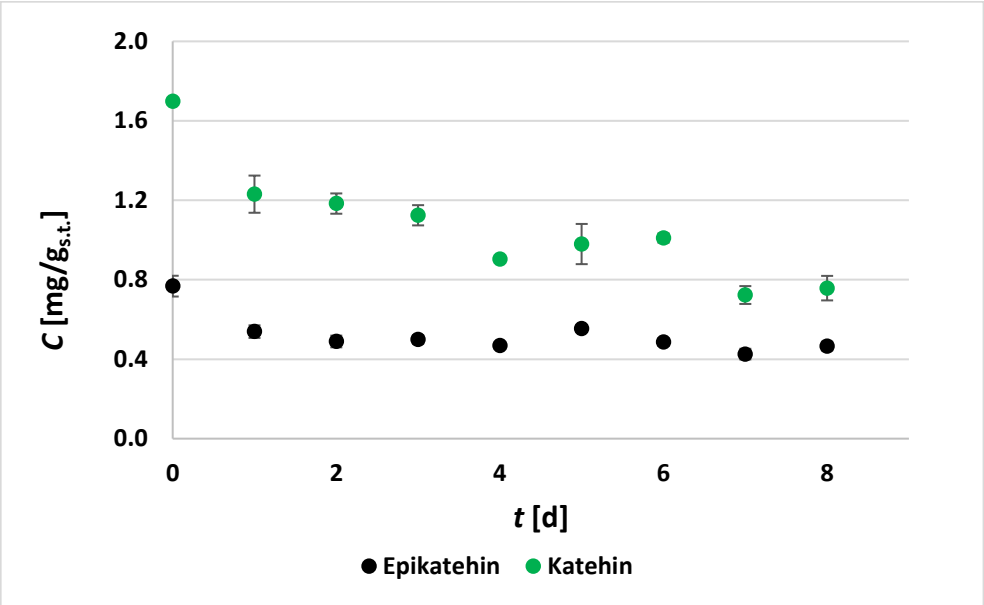
Slika 24 Srednje vrijednosti masenog udjela elaginske kiseline i *p*-hidroksibenzojeve kiseline (*C*) u ekstraktima početnog i biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (*t*)

Slika 25 prikazuje srednje vrijednosti masenog udjela *p*-kumarinske kiseline i vanilinske kiseline (*C*) u ekstraktima početnog i biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (*t*). Kod obje fenolne kiseline došlo je do porasta masenog udjela nakon prvog dana biološke obrade u odnosu na početni biološki neobrađeni uzorak tropa grožđa. Maseni udio *p*-kumarinske kiseline u početnom uzorku tropa grožđa iznosio je 0,0103 mg/$g_{s.t.}$, a nakon prvog dana biološke obrade 0,0129 mg/$g_{s.t.}$ te se vrijednost nakon drugog i trećeg dana fermentacije malo smanjila i do osmog dana fermentacije nije se značajno mijenjala. Maseni udio vanilinske kiseline u početnom uzorku tropa grožđa iznosio 0,035 mg/$g_{s.t.}$, a nakon prvog dana biološke obrade 0,039 mg/$g_{s.t.}$, nakon čega je opadao sve do osmog dana fermentacije.



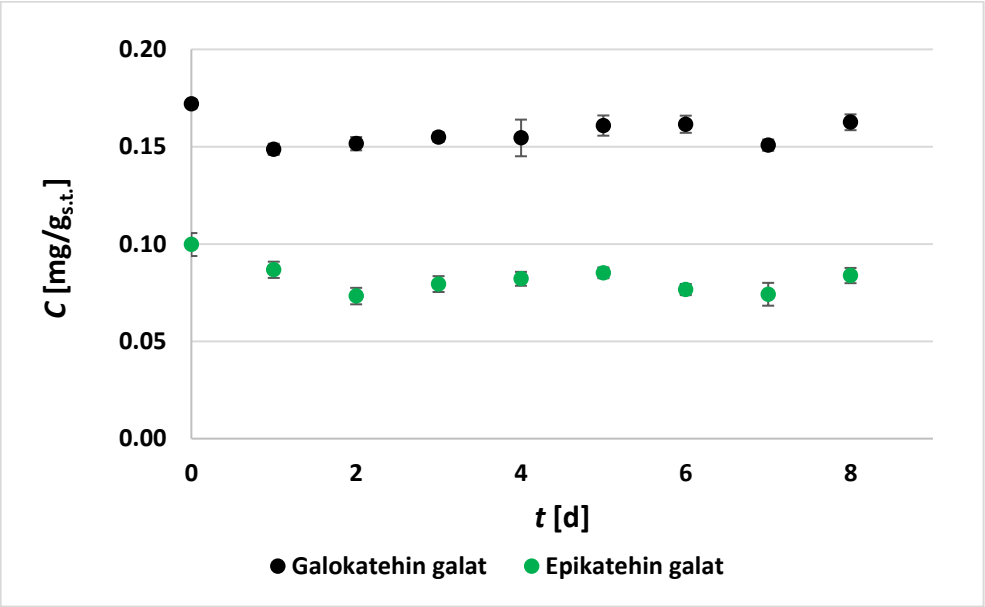
Slika 25 Srednje vrijednosti masenog udjela *p*-kumarinske kiseline i vanilinske kiseline (*C*) u ekstraktima početnog i biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (*t*)

Slika 26 prikazuje srednje vrijednosti masenog udjela epikatehina i katehina (*C*) u ekstraktima početnog i biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (*t*). Maksimalni maseni udio epikatehina (0,768 mg/$g_{s.t.}$) i katehina (1,698 mg/$g_{s.t.}$) izmjeren je u početnom biološki neobrađenom uzorku tropa grožđa. Prilikom provedbe biološke obrade pomoću *P. chrysosporium* nakon prvog dana fermentacije njihov maseni udio se smanjio u odnosu na početni biološki neobrađeni uzorak te se smanjivao sve do osmog dana fermentacije.



Slika 26 Srednje vrijednosti masenog udjela katehina i epikatehina (*C*) u ekstraktima početnog i biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (*t*)

Slika 27 prikazuje srednje vrijednosti masenog udjela galokatehin galata i epikatehin galata (*C*) u ekstraktima početnog i biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (*t*). Maksimalni maseni udio galokatehin galata (0,172 mg/$g_{s.t.}$) i epikatehin galata (0,099 mg/$g_{s.t.}$) izmjeren je u početnom biološki neobrađenom uzorku tropa grožđa. Nakon prvog dana fermentacije njihov maseni udio se smanjio u odnosu na početni biološki neobrađeni uzorak. U slučaju galokatehin galata zabilježen je blagi porast do šestog dana fermentacije, a sedmi dan fermentacije maseni udio se smanjio te osmi dan opet malo porastao. U slučaju epikatehin galata maseni udio se smanjio tijekom prva dva dana biološke obrade, zatim je rastao do petog dana fermentacije. Šesti i sedmi dan fermentacije došlo je do smanjenja masenog udjela epikatehin galata, a osmi dan udio je malo porastao.



Slika 27 Srednje vrijednosti masenog udjela galokatehin galata i epikatehin galata (*C*) u ekstraktima početnog i biološki obrađenog tropa grožđa u ovisnosti o vremenu fermentacije (*t*)

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka, njihove statističke obrade i rasprave izvedeni su sljedeći zaključci:

- Trop grožđa predstavlja lignocelulozni materijal koji je moguće koristiti u SSF procesu kao supstrat za *P. chrysosporium* jer sadrži hranjive tvari koje mikroorganizam koristi za rast i razvoj.
- Tijekom osam dana biološke obrade tropa grožđa s *P. chrysosporium* masa supstrata opadala je svakim danom provođenja pokusa. Nakon osam dana fermentacije masa supstrata smanjila se za 17,07 %.
- Maseni udio ukupnih polifenolnih spojeva bio je najveći u početnom uzorku bez biološke obrade i iznosio je 43,79 $mg_{GAE}/g_{s.t.}$, kao i maseni udio ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina (8,19 $mg/g_{s.t.}$).
- Maseni udio ukupnih flavonoida bio je najveći u uzorku nakon četvrtog dana biološke obrade i iznosio je 17,47 $mg_{CE}/g_{s.t.}$, dok je udio proteina maksimalnu vrijednost imao nakon prvog dana biološke obrade (22,44 $mg_{BSA}/g_{s.t.}$).
- Antioksidacijska aktivnost ekstrakata bila je najveća u početnom uzorku bez biološke obrade te u uzorku nakon osam dana biološke obrade te je iznosila 0,21 $g_{TE}/g_{s.t.}$.
- U ekstraktima tropa grožđa identificirano je i kvantificirano sedam fenolnih kiselina: galna kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, siringinska kiselina, elaginska kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, *p*-kumarinska kiselina i vanilinska kiselina. Može se zaključiti da je biološka obrada tropa grožđa pomoću *P. chrysosporium* utjecala na povećanje navedenih fenolnih kiselina u odnosu na početni biološki neobrađeni uzorak tropa grožđa pri čemu je došlo do povećanja masenog udjela za 1,53-, 1,32-, 1,11-, 1,24-, 1,22-, 1,25-, odnosno 1,10- puta.
- Galna kiselina dokazana je u najvećoj koncentraciji pri čemu je najbolji prinos (0,322 $mg/g_{s.t.}$) uočen nakon 7. dana SSF-a.
- U ekstraktima tropa grožđa identificirani su i kvantificirani flavan-3-oli: epikatehin, katehin, galokatehin galat i epikatehin galat. Maksimalna vrijednost masenog udjela navedenih flavan-3-ola dokazana je u početnom biološki neobrađenom

uzorku tropa grožđa (epikatehin: 0,768 mg/$g_{s.t.}$, katehin: 1,698 mg/$g_{s.t.}$, galokatehin galat: 0,172 mg/$g_{s.t.}$, epikatehin galat: 0,099 mg/$g_{s.t.}$).

6. LITERATURA

AgroNature Nigeria, 2021. https://agronaturenigeria.com/how-nigeria-can-generate-electricity-from-cassava-peels/ [07.06.2021.]

Ajila C, Sarma S, Brar S, Godbout S, Cote M, Guay F, Verma M, Valéro J: Fermented Apple Pomace as a Feed Additive to Enhance Growth Performance of Growing Pigs and Its Effects on Emissions. *Agriculture*, 5:313–329, 2015. https://doi.org/10.3390/agriculture5020313

Ashok A, Doriya K, Rao DRM, Kumar DS: Design of solid state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9:11–18, 2017. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.014

Bender ABB, Speroni CS, Moro KIB, Morisso FDP, dos Santos DR, da Silva LP, Penna NG: Effects of micronization on dietary fiber composition, physicochemical properties, phenolic compounds, and antioxidant capacity of grape pomace and its dietary fiber concentrate. *LWT Food Science and Technology*, 117:108652, 2020. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108652

Bocm Pauls d.o.o., 2012. https://bocmpauli.en.ec21.com/offer_detail/Sell_Sugar_Beet_Residues_Sugar--18664900.html [07.06.2021.]

Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Tišma M: Trop grožđa - otpad i visokovrijedna sirovina. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije*, 111-131. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2017a.

Bucić-Kojić A, Šelo G, Zelić B, Planinić M, Tišma M: Recovery of phenolic acid and enzyme production from corn silage biologically treated by *Trametes versicolor*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 181(3):948–960, 2017b.

Costa S, Dedola D, Pellizzari S, Blo R, Rugiero I, Pedrini P, Tamburini E: Lignin Biodegradation in Pulp-and-Paper Mill Wastewater by Selected White Rot Fungi. *Water*, 9(12):935, 2017. https://doi.org/10.3390/w9120935

Dávila I, Robles E, Egüés I, Labidi J, Gullón P: The Biorefinery Concept for the Industrial Valorization of Grape Processing By-Products. U *Handbook of Grape Processing By-Products*, 29–53, Elsevier, 2017. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00002-8

Dwyer K, Hosseinian F, Rod M: The Market Potential of Grape Waste Alternatives. *Journal of Food Research*, 3(2):91, 2014. https://doi.org/10.5539/jfr.v3n2p91

Elisashvili V, Kachlishvili E, Tsiklauri N, Metreveli E, Khardziani T, Agathos SN: Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot *Basidiomycetes* isolated from the forests of Georgia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2):331–339, 2017. https://doi.org/10.1007/s11274-008-9897-x

Farinas CS: Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52: 179–188, 2015. https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092

Farinas CS, Vitcosque GL, Fonseca RF, Neto VB, Couri S: Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. *Industrial Crops and Products*, 34(1):1186–1192, 2011. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.006

Franjo M: Proizvodnja lignolitičkih enzima porijeklom iz *Phanerochaete chrysosporium*. *Završni rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.

Fraser SJ: Intraspecific comparison of *Phanerochaete chrysosporium* strains: peroxidase production, pollutant degradation and mycelial differentiation. *Doktorska disertacija*. Sveučilište Rhodes, Grahamstown, Južnoafrička Republika, 2005.

Gowman A, Rodriguez-Uribe A, Defersha F, Mohanty AK, Misra M: Statistical design of sustainable composites from poly(lactic acid) and grape pomace. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(36):49061, 2020. https://doi.org/10.1002/app.49061

Hildén K, Mäkelä MR: Role of Fungi in Wood Decay. U *Reference Module in Life Sciences*, B9780128096338125000, Elsevier, 2018. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12424-0

Hodak H: Učinak uvjeta sušenja na fenolni sastav i antioksidacijski kapacitet imele (*Viscum album* L.). *Diplomski rad*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2019.

Hu L, Zeng G, Chen G, Huang Z, Wan J, Chen A, Yu Z, Yang J, He K, Qin L: Bioaccumulation and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in *Phanerochaete chrysosporium*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159:303–311, 2017. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.006

Huang C, Lai C, Zeng G, Huang D, Xu P, Zhang C, Cheng M, Wan J: Manganese-enhanced degradation of lignocellulosic waste by *Phanerochaete chrysosporium*: Evidence of enzyme activity and gene transcription. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(16):6541–6549, 2017. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8371-9

Huang D, Guo X, Peng Z, Zeng G, Xu P, Gong X, Deng R, Xue W, Wang R, Yi H, Liu C: White rot fungi and advanced combined biotechnology with nanomaterials: Promising tools for endocrine-disrupting compounds biotransformation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(5): 671–689, 2018. https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1386613

Iandolo D, Piscitelli A, Sannia G, Faraco V: Enzyme Production by Solid Substrate Fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on Tomato Pomace. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(1):40–51, 2011. https://doi.org/10.1007/s12010-010-9014-0

Jain A, Morlok CK, Henson JM: Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium*

phytofermentans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2):905–917, 2013. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4511-4

Kovalcik A, Pernicova I, Obruca S, Szotkowski M, Enev V, Kalina M, Marova I: Grape winery waste as a promising feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates and other value-added products. *Food and Bioproducts Processing*, 124:1–10, 2020. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.08.003

Kuzmanović M: Utjecaj biološke obrade tropa grožđa pomoću *Trametes versicolor* na ekstrakciju fenolnih spojeva. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2014.

Madadi M, Abbas A: Lignin Degradation by Fungal Pretreatment: A Review. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 8(2):389, 2017. https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000398

Martínez O, Sánchez A, Font X, Barrena R: Valorization of sugarcane bagasse and sugar beet molasses using *Kluyveromyces marxianus* for producing value-added aroma compounds via solid-state fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 158:8–17, 2017. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.04.155

Marzo C, Díaz AB, Caro I, Blandino A: Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy*, 37(2):149–156, 2019. https://doi.org/10.1177/0734242X18798699

Mir-Tutusaus JA, Baccar R, Caminal G, Sarrà M: Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. *Water Research*, 138:137–151, 2018. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.056

Mitchell David A, Berović M, Krieger N: Overview of solid state bioprocessing. U *Biotechnology Annual Review*, 8:183–225, 2002. https://doi.org/10.1016/S1387-2656(02)08009-2

Mitchell David A, Krieger N, Berović M: *Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation*. Springer, 2006.

Mitchell David A, Krieger N: Solid-State Cultivation Bioreactors. U A. Berenjian (Ur.), *Essentials in Fermentation Technology*, 105–133, Springer, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6_4

Mussato SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA: Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. U K.-Y. Show (Ur.), *Industrial Waste*. InTech, 2012. https://doi.org/10.5772/36310

Okal EJ, Aslam MM, Karanja JK, Nyimbo WJ: Mini review: Advances in understanding regulation of cellulase enzyme in white-rot basidiomycetes. *Microbial Pathogenesis*, *147*:104410, 2020. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104410

Ozcirak Ergun S, Ozturk Urek R: Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science*, 15(2):273–277, 2017. https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.003

Pandey A, Soccol CR, Mitchell D: New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35(10):1153–1169, 2000. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00152-7

Pinova d.o.o., 2021. http://pinova.hr/hr_HR/baza-znanja/ratarstvo/secerna-repa/morfologija-secerne-repe [25.06.2021.]

Pirota RDPB, Tonelotto M, Delabona PS, Fonseca RF, Paixão DAA, Baleeiro FCF, Bertucci NV, Farinas CS: Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. *Industrial Crops and Products*, 45:465–471, 2013. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.010

Planinić M, Zelić B, Čubel I, Bucić-Kojić A, Tišma M: Corn forage biological pretreatment by *Trametes versicolor* in a tray bioreactor. *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy*, 34(8):802–809, 2016. https://doi.org/10.1177/0734242X16654979

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. *Katalog opreme*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2019.

Qureshi AS, Khushk I, Ali CH, Chisti Y, Ahmad A, Majeed H: Coproduction of protease and amylase by thermophilic *Bacillus* sp. BBXS-2 using open solid-state fermentation of lignocellulosic biomass. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8:146–151, 2016. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.09.006

Rashad MM., Abdou HM, Mahmoud AE: Production of some bioactive materials by *Pleurotus ostreatus* from pineapple residues and rice straw via solid state fermentation. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(5):2730-2736, 2016.

Ravindran R, Hassan S, Williams G, Jaiswal A: A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. *Bioengineering*, 5(4):93, 2018. https://doi.org/10.3390/bioengineering5040093

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26:1231–1237, 1999. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Rodríguez Couto S: Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnology Journal*, 3(7):859–870, 2008. https://doi.org/10.1002/biot.200800031

Rodríguez Couto S, López E, Sanromán MÁ: Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors. *Journal of Food Engineering*, 74(2):263–267, 2006. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.004

Rodríguez LA, Toro ME, Vazquez F, Correa-Daneri ML, Gouiric SC, Vallejo MD: Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(11):5914–5917, 2010. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.12.112

Rodríguez-Couto S: Industrial and environmental applications of white-rot fungi. *Mycosphere*, 8(3):456–466, 2017. https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/3/7

Sadh PK, Duhan S, Duhan JS: Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: A review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5:1, 2018 https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z

Santos da Silveira J, Durand N, Lacour S, Belleville MP, Perez A, Loiseau G, Dornier M: Solid-state fermentation as a sustainable method for coffee pulp treatment and production of an extract rich in chlorogenic acids. *Food and Bioproducts Processing*, *115*:175–184, 2019. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.04.001

Schofield P, Mbugua DM, Pell AN: Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*: 91:21-40, 2001.

Singh D, Chen S: The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*(3):399–417, 2008. https://doi.org/10.1007/s00253-008-1706-9

Singh SK, Sczakas G, Soccol CR, Pandey A: Production of Enzymes by Solid-state Fermentation. U A. Pandey, C. R. Soccol, & C. Larroche (Ur.), *Current Developments in Solid-state Fermentation*, 183–204, Springer, New York, 2008. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75213-6_9

Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A: Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1):13–18, 2009. https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019

Soccol CR, Costa ESF, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LPS: Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1):52–71, 2017. https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002

Sosa-Martínez JD, Balagurusamy N, Montañez J, Peralta RA, Moreira RFPM, Bracht A, Peralta RM, Morales-Oyervides L: Synthetic dyes biodegradation by fungal ligninolytic enzymes: Process optimization, metabolites evaluation and toxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 400:123254, 2020. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123254

Strelec I, Kovač T: Praktikum iz biokemije. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2014.

Teixeira A, Baenas N, Dominguez-Perles R, Barros A, Rosa E, Moreno D, Garcia-Viguera C: Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A

Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9):15638–15678, 2014. https://doi.org/10.3390/ijms150915638

Thomas L, Larroche C, Pandey A: Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81:146–161, 2013. https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013

Whiteford R, Nurika I, Schiller T, Barker G: The white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*, under combinatorial stress produces variable oil profiles following analysis of secondary metabolites. *Journal of Applied Microbiology*, 2021. https://doi.org/10.1111/jam.15013

Wine & Spirit Education Trust, 2021. https://www.wsetglobal.com/knowledge-centre/blog/2020/april/22/what-is-brandy?utm_source=Facebook&utm_medium=Social&utm_campaign=A_WhatsBrandy [07.06.2021.]

Yu J, Ahmedna M: Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(2):221–237, 2013. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x

Zeng G, Cheng M, Huang D, Lai C, Xu P, Wei Z, Li N, Zhang C, He X, He Y: Study of the degradation of methylene blue by semi-solid-state fermentation of agricultural residues with *Phanerochaete chrysosporium* and reutilization of fermented residues. *Waste Management*, 38:424–430, 2015. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.01.012

Zhu F, Du B, Zheng L, Li J: Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chemistry*, 186:207–212, 2015. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.057