Određivanje koncentracije šećera tijekom biološke obrade tropa grožđa pomoću Trametes versicolor

Jovanovac, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:109:988927

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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 OSIJEK

Marko Jovanovac

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ŠEĆERA TIJEKOM BIOLOŠKE OBRADE TROPA GROŽĐA POMOĆU *Trametes versicolor*

DIPLOMSKI RAD

Osijek, travanj 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za tehnološke operacije
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 I. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 27. listopada 2016.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Ana Bucić-Kojić*

Određivanje koncentracije šećera tijekom biološke obrade tropa grožđa pomoću *Trametes versicolor*
Marko Jovanovac, 279-DI

Sažetak: Trop grožđa je otpad koji zaostaje nakon proizvodnje vina, te se u većini slučajeva bez dodatne obrade odlaže na deponije, u vinograde kao dodatak gnojivu ili se u krajnjem slučaju spaljuje. Primjenom europskih regulativa, takav način zbrinjavanja je neprihvatljiv. Trop grožđa je energetski i nutritivno visokovrijedna sirovina budući da predstavlja bogat izvor biološki aktivnih fenolnih spojeva te šećera koji su između ostalog neophodni u proizvodnji visokovrijednih produkata, primjerice bioetanola i bioplina.U ovom radu provedena je kruto-tekuća ekstrakcija šećera (uvjeti: temperatura 30 °C, vrijeme 30 min, broj okretaja tresilice 170 rpm, omjer kruto-tekuće 25 mL/g) iz neobrađenog i biološki obrađenog tropa grožđa gljivom bijelog truljenja *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima s ciljem praćenja koncentracije i potrošnje šećera tijekom 15 dana fermentacije. Najzastupljeniji šećer u analiziranim ekstraktima biološki neobrađenog tropa grožđa bila je fruktoza (7,09 mg/g), a potom su slijedile glukoza (5,72 mg/g), maltotrioza (3,88 mg/g.), maltoza (2,48 mg/g) i saharoza (0,63 mg/g). Praćenjem koncentracije pojedinačnih šećera u ekstraktima biološki obrađenog tropa grožđa tijekom 15 dana utvrđeno je da se najznačajnije promjene u koncentraciji promatranih šećera događaju u prvih 6-7 dana fermentacije gdje su se udjeli fruktoze, glukoze, maltotrioze i saharoze smanjivali u odnosu na početnu vrijednost, a udio maltoze je bio konstantan prvih pet dana fermentacije te se potom povećavao nakon šestog dana fermentacije.

Ključne riječi: trop grožđa, *Trametes versicolor*, šećeri u grožđanom tropu

Rad sadrži: 45 stranica
21 slika
7 tablica
30 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1. izv. prof. dr. sc. *Marina Tišma*	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. *Ana Bucić-Kojić*	član-mentor
3. izv. prof. dr. sc. *Mirela Planinić*	član
4. izv. prof. dr. sc. *Sandra Budžaki*	zamjena člana

Datum obrane: 11. travnja 2017.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process engineering
Subdepartment of Unit operations
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program 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. IX held on October 27, 2016

Mentor: *Ana Bucić-Kojić*, PhD, associate prof.

Determination of sugar concentration during biological treatment of grape pomace with *Trametes versicolor*
Marko Jovanovac, 279-DI

Summary: Grape pomace is a waste remaining after wine production, and in most cases it ends up in landfills without previous treatment, in vineyards as a fertilizers or ultimately, incinerated. By European regulations, this method of disposal is unacceptable. Grape pomace is energy and nutritionally valuable raw material as it represents a rich source of biologically active phenolic compounds and sugars, which is necessary in the production of high value products, such as bioethanol and biogas.
In this paper, solid-liquid extraction(conditions: temperature 30 °C, 30 minutes, speed shaker 170 rpm, the liquid-solid ratio 25 mL/g) of sugars from untreated and biologically treated grape pomace with *Trametes versicolor* was performed. The most common sugar in extract of untreated grape pomace was fructose (7.09 mg/g) followed by glucose (5.72 mg/g), maltotriose (3.88 mg/g), maltose (2.48 mg/g) and sucrose (0.63 mg/g).Concentration monitoring of the individual sugars in biologically treated grape pomace extracts during 15 days of fermentation showed that the most significant changes occurred in first 6 – 7 days of fermentation. Fructose, glucose, maltotriose and sucrose content was decreased in relation to initial value and maltose content was constant up to 5th day of fermentation and after 6th day of fermentation it was increased.

Keywords: Grape pomace, *Trametes versicolor,* sugars in grape pomace

Thesiscontains: 45 pages
21 figures
7 tables
30 references

Original in: Croatian

Defensecommittee:

1. *Marina Tišma,* PhD, assistant prof. — chairperson
2. *Ana Bucić-Kojić,* PhD, associate prof. — supervisor
3. *Mirela Planinić*, PhD, associate prof. — member
4. *Sandra Budžaki*, PhD, associate prof. — stand-in

Defense date: 11th April 2017

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

Zahvaljujem mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Bucić-Kojić, na temi diplomskog radu te na prihvaćanju mene kao svojeg diplomanta.

Kroz rad, razgovor i savjete potvrdili ste mi da sam izabrao ono što želim. Hvala na uloženom vremenu, trudu i pomoći oko izrade ovog rada te na vedrom duhu i neizmjernoj strpljivosti.

Također, zahvaljujem se kolegici Meliti Lončarić na nesebičnoj pomoći i velikom strpljenju. Hvala, bilo mi je drago raditi s tobom.

Hvala i tehničarki Jelki Babić. Vašom pomoći olakšali ste mi rad. Hvala Vam na pomoći i strpljenju.

Hvala svim mojim prijateljima na podršci, razumijevanju i pomoći, uz vas je ovaj studij bio najbolje razdoblje u mojem životu.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima na neiscrpnoj podršci, poticaju, pomoći i uloženom trudu. Isto tako zahvaljujem se braći i sestrama na ukazanom poticaju i podršci tokom cijelog studija.

.

PRO BIO TECH

Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta

STRUKTURNI I INVESTICIJSKI FONDOVI

KONKURENTNA HRVATSKA

Ulaganje u budućnost!
Europska unija

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2.TEORIJSKI DIO 1

2.1 Sastav tropa grožđa 5

2.1.1 Peteljka 5

2.1.2 Sjemenke 6

2.1.3 Kožica 6

2.2 Gljive bijelog truljenja 8

2.2.1. Gljiva *Trametes versicolor* 8

2.3. Šećeri tropa grožđa 10

2.3.1. Glukoza (grožđani šećer) 10

2.3.2. Fruktoza 11

2.3.3. Saharoza 11

2.3.4. Maltoza 12

2.3.5. Maltotrioza 12

2.4. Fermentacija na čvrstim nosačima 13

2.5. Ekstrakcija 14

2.5.1. Ekstrakcija kruto-tekuće 16

2.6.Kromatografske metode u analizi uzorka 16

3. EKSPERIMENTALNI DIO 19

3.1. ZADATAK 20

3.2. Materijali i metode 20

3.2.1 Materijali 20

3.2.2. Biološka obrada tropa grožđa pomoću *Trametes versicolor* 20

3.2.3. Određivanje suhe tvari 21

3.2.4. Kruto-tekuća ekstrakcija šećera iz tropa grožđa 22

3.2.5. Provedba kruto-tekuće ekstrakcije šećera iz tropa grožđa 22

3.2.6. Priprema ekstrakta za analizu 22

3.2.7. Određivanje koncentracije šećera u ekstraktima tropa grožđa 23

4. REZULTATI 25

4.1. Određivanje suhe tvari 26

4.2. Izračunavanje masenog udjela pojedinačnih šećera u ekstraktima grožđanog tropa 27

4.3. Maseni udio pojedinačnih šećera u ekstraktima grožđanog tropa 28
5. RASPRAVA 36
6. ZAKLJUČCI 40
7. LITERATURA 42

1. UVOD

Kruti otpad koji zaostaje nakon proizvodnje vina poznat pod nazivom grožđani trop, najčešće se odlaže na deponije ili koristi kao dodatak gnojivu prilikom uzgoja vinove loze. Međutim, zbog sve strožih regulativa Europske unije, odlaganje organskog otpada bez prethodne obrade je postalo zabranjeno, stoga je i odlaganje takvog otpada postalo neekonomično. Ako se trop ne tretira propisno, može predstavljati veliki rizik za okoliš, od površinskih i dubinskih zagađenja vode pa sve do neugodnih mirisa koji se razvijaju tijekom njezina stajanja. Velike nakupine tropa privlače muhe i štetočine te mogu dovesti do pojave i širenja raznih bolesti (Voća, 2010.).

Upravo zbog navedenih razloga, posljednjih godina povećan je interes za zbrinjavanje otpada vinarija te za mogućnošću korištenja tropa grožđa u korisne produkte. Primjerice trop se koristi u proizvodnji stočne hrane te ulja iz koštica koja imaju primjenu u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, a može se razmatrati i kao visokovrijedna sirovina budući da predstavlja bogat izvor biološki aktivnih fenolnih spojeva kojima se pripisuju brojni pozitivni učinci na ljudsko zdravlje i stabilnost hrane zbog izraženog antioksidacijskog djelovanja. Osim toga, zbog visokog udjela organske tvari i kalija te značajnih količina dušika i fosfora, ovaj materijal može se koristiti kao biognojivo, ali i u proizvodnji energije (Korkie i sur., 2002.). To je u razvijenim zemljama već standardna praksa, dok kod nas vinari još uvijek nisu upoznati s tim postupcima ili jednostavno nisu dovoljno ekološki osviješteni i poduzetni da bi ulagali u takav oblik proizvodnje.

Trop grožđa koji zaostaje nakon proizvodnje vina sadrži određene količine šećera. Najzastupljeniji su glukoza, fruktoza i saharoza te četiri glavna polisaharida, celuloza hemiceluloza, škrob i pektin. Polimerni ugljikohidrati tropa grožđa mogu biti potencijalni izvor fermentabilnih šećera koji su od komercijalnog interesa za vinarije u proizvodnji vina (Korkie i sur., 2002.). Budući da su polisaharidi u tropu grožđa često „zarobljeni“ u kompleksnoj strukturi sa ligninom potrebno je prvo provesti razgradnju lignina pri čemu bi se oslobodile celuloza i hemiceluloza koje se dalje mogu hidrolizirati u monosaharide koji su neophodni proizvodnji nekih korisnih produkata npr. bioetanola i bioplina.
Sposobnost razgradnje lignina na jednostavnije spojeve imaju gljive bijelog truljenja uslijed djelovanja njihovih oksidativnih ekstracelularnih enzima. Gljive bijelog truljenja mogu se uzgajati u submerznim uvjetima i u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

U ovom radu trop grožđe je obrađen gljivom bijelog truljenja *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima te je praćena koncentracija šećera prisutnih u ekstraktima tijekom 15 dana fermentacije.

2.TEORIJSKI DIO

2.1 Sastav tropa grožđa

Trop (drop, komina, kom) je čvrsti ostatak koji zaostaje nakon procesa tiještenja (prešanja) izmuljenog ili usitnjenog voća, ponajprije grožđa. Trop se sastoji od peteljki, kožice, sjemenki i manjeg udjela pulpe.

S više od 60 milijuna tona godišnje proizvodnje, grožđe predstavlja jednu od najznačajnijih voćnih kultura:

- 80% se koristi u proizvodnji vina,
- 20-30% mase prerađenog grožđa zaostaje kao vlažni vinski trop.

Vinogradske površine u Republici Hrvatskoj zauzimaju ukupno oko 20 000ha prema zadnjim podacima; godišnji urod s tih površina godišnje iznosi oko 90 000t, od kojih 23 000t preostaje kao trop grožđa (Agencija za plaćanje u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju, 2017.)

2.1.1 Peteljka

Peteljka predstavlja kostur grozda. Sastoji se od osnovnog dijela koji se grana, završava sa peteljčicama koje nose cvijet i nakon oplodnje bobicu. Udio peteljke u grozdu iznosi 2 – 5%, a one kemijskim sastavom utječu na kakvoću vina: sorte s manjom zastupljenošću peteljke u grožđu imaju veće iskorištenje i obratno.
Peteljka je bogata polifenolima, posebno kod crnih sorata. Ako se tijekom prerade peteljka ne odvaja, ukupna količina polifenola u vinu može biti povećana i do 25%. Sadržaj fenolnih spojeva peteljke prikazan je u **Tablici 1**.

Tablica 1: Sadržaj fenolnih spojeva u peteljci (Ribéreau-Gayon i sur., 1976.)

Sastojak	% u grozdu
Ukupni polifenoli	20
Tanini	15
Procijanidini	26
Katehini	15
Galna kiselina	16

2.1.2 Sjemenke

Sjemenka se sastoji od masne jezgre koju okružuje drvena ljuska prekrivena taninskom kutikulom. Prešani trop grožđa sadrži 20 do 30% sjemenki. Sjemenke grožđa sadrže oko 40% vlakana, 16% ulja, 11% proteina i 7% polifenolnih spojeva,nešto šećera i mineralnih tvari. Kemijski sastav sjemenki prikazan je u **Tablici 2**, dok je u **Tablici 3** sadržaj fenolnih spojeva (Ribéreau-Gayon i sur., 1976.).

Najviše tanina, od svih čvrstih dijelova grozda, nalazi se u sjemenkama.

Tablica 2: Kemijski sastav sjemenki (Ribéreau-Gayon i sur., 1976.)

Sastojak	u 100g
Voda	25 – 45
Ugljikohidrati	31 – 36
Ulja	13 – 20
Tanini	4 – 6
Dušični spojevi	4 – 6,5
Minerali	2 – 4
Masne kiseline	1

Tablica 3: Sadržaj fenolnih spojeva u sjemenci (Ribéreau-Gayon i sur., 1976.)

Sastojak	% u grozdu
Ukupni fenoli	22 – 56
Procijanidini	28 – 56
Katehini	67 – 86
Galna i kava kiselina	-

2.1.3 Kožica

Kožica predstavlja vanjski omotač bobice koji se sastoji od 6 – 10 slojeva stanica. Na površini kožice nalazi se voštani sloj koji sadrži mikrofloru bobice – mikroorganizme, kvasce i bakterije koje su donijeli vjetar i kukci.

Po kemijskom sastavu kožica (**Tablica 4**) je siromašna šećerima, a bogata je celulozom i netopljivim pektinima i proteinima. Kožica je bogata fenolima (**Tablica 5**) (kod crnih sorata duplo više), ali još uvijek je količina znatno manja nego u peteljci.

Tablica 4: Kemijski sastav kožice (Ribéreau-Gayon i sur., 1976.)

Sastojak	%
Voda	58 – 82
Pentoza i pentozini	1 – 1,2
Celuloza	3,5
Pektin, smole i sluzi	0,9
Kiseline	0,13 – 0,67
Tanini	0,01 – 15,4
Dušični spojevi	0,8 – 1,9
Masti	1,5
Minerali	2,0 – 3,7

Tablica 5: Sadržaj fenolnih spojeva u kožici (Ribéreau-Gayon i sur., 1976.)

Sastojak	% u grozdu
Ukupni polifenoli	12 – 61
Procijanidini	17 – 47
Taninski spojevi	14 – 50
Antocijani	100

2.2 Gljive bijelog truljenja

Gljive truljenja su jedini poznati organizmi koji razgrađuju drvo, a u prirodi nastanjuju na mrtvom ili živom drvetu te se mogu podijeliti u tri grupe (Bruce i Palferyman, 1998.)

- gljive bijelog truljenja
- gljive smeđeg truljenja
- gljive blagog truljenja

Gljivama bijelog tuljenja pripadaju razredi Basidiomycota i Ascomycotae imaju sposobnost razgraditi lignin i lignocelulozne supstrate. Razgradnja prirodnog polimera lignina u molekule manje molekularne mase gljivama bijelog truljenja odvija se lučenjem smjese ekstracelularnih lignolitičkih enzima. Gljive bijelog truljenja ne mogu iskoristiti lignin kao izvor ugljika za svoj rast i razvoj te su stoga primorane, izvanstaničnim enzimima razgraditi lignin do celuloze koju koriste kao drugi izvor ugljika (Gadd, 2001.). Gljive bijelog truljenja često se koriste za bioremedijacijske procese, budući da im njihovi izvanstanični enzimi omogućuju podnošenje nepovoljnih i toksičnih uvjeta kao što su visoke te niske temperature ili povišena pH vrijednost (Altman, 1998.).

Kod ovih gljiva za razgradnju važna je kombinacija izvanstaničnih lignolitičkih enzima lignin peroksidaze (LiP), mangan peroksidaze (MnP) i lakaze. Prema strukturi i vrsti proizvodnje lignolitičkih enzima, gljive bijelog truljenja se dijele u tri skupine (Lankinen, 2004.):

- gljive koje proizvode LiP, MnP i lakazu
- gljive koje proizvode MnP i lakazu
- gljive koje proizvode LiP i lakazu.

2.2.1. Gljiva *Trametes versicolor*

*Trametes versicolor*ili šarena tvrdokoška je gljiva bijelog truljenja te pripada razredu Basidiomycota koja raste u drvenim nakupinama ili preklapajućim formacijama na deblima, izbojcima te slomljenim granama mrtvog i raspadajućeg, a ponekad i na mjestima rana živog drveća (***Slika 1.***). Gljive bijelog truljenja uzrokuju delignifikaciju drveta te je široko rasprostranjena pojava u prirodi. Također je poznata i pod imenima *Coriolus versicolor.*

Šarena tvrdokoška proizvodi tri lignolitička enzima, lakazu (Lac), mangan peroksidazu (MnP) i lignin peroksidazu (LiP), koje svojim djelovanjem razgrađuju lignin, policikličke aromatske ugljikovodike, polikloriranih bifenila i druge sintetičke boje. Proizvodnja lakaze kod gljiva bijelog truljenja može se potaknuti učestalim nedostatkom hranjivih tvari ili lakše prisutnošću neke fenolne komponentne u hranjivom mediju. Dodatkom različitih induktora može se potaknuti povećana proizvodnja lignolitičkih enzima, neki od tih induktora mogu biti bakar, veratilni alkohol te fenolni spojevi (Xavier i sur., 2007.).



Slika 1. Gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor*

Najveća postignuća *Trametes versicolor* bilježi u industriji pulpe i papira gdje uspješno obavlja delignifikaciju, izbjeljivanje i omekšavanje pulpe, te isto tako obezbojava izlazne tokove nastale izbjeljivanjem pulpe. Gljive mogu razgraditi gotovo sve prirodne materijale, a *Trametes versicolor* razgrađuje ili akumulira neke od današnjih najgorih onečišćivača okoliša poput antracena, dioksina, organofosfata, pentaklorofenola (PKF) i trinitrotoluena (TNT), a koristi se i u bioremedijaciji onečišćenja tekstilnim bojama (Webster i Weber, 2007.; Thalaro i Thalaro, 1996.). Primjenom gljive bijelog truljenja u industriji, izbjegava se upotreba jakih organskih ili anorganskih kiselina te drugih kemikalija koje onečišćuju okoliš (Young i Masood, 1998.).

2.3. Šećeri tropa grožđa

Kemijski sastav tropa grožđa ovisi o mnogim faktorima kao što su zrelost grožđa, vrsta grožđa, regija uzgoja i godina uzgoja. Trop grožđa sadrži jednak sastav šećera kao i grožđe iste sorte, samo u manjim količinama radi prijašnje obrade. Tako su među najzastupljeniji šećerima glukoza i fruktoza kao monosaharidi, te saharoza i maltoza od disaharida a potom neke manje zastupljene pentoze. U nezrelom grožđu udio glukoze je znatno veći (oko 2 puta) nego fruktoze. Tijekom sazrijevanjem grožđa omjer ova dva šećera se smanjuje, da bi u punoj zrelosti njihova vrijednost bila približno jednaka. Od šarka pa do pune zrelosti, količina oba šećera se povećava, ali je intenzitet nakupljanja fruktoze znatno veći. Glukoza i fruktoza, čine najveći dio ukupnog sadržaja ugljikohidrata, s tim da je odnos glu/fru 0,92-0,95. Količina saharoze je niska, oko 1-3g/L, jer se brzo hidrolizira do glukoze i fruktoze. Arabinoza, ramnoza, galaktoza, ksiloza, rafinoza se nalaze u tragovima jer su oni sastojci polimernih ugljikohidrata. Polimeri koji dolaze iz staničnih stjenki su celuloza, hemiceluloza i pektin. U pojedinim dijelovima bobice, koncentracija šećera je različita. U dijelu bobice bližem peteljci ima više šećera, nego u dijelu koji je pri peteljci. Polazeći od pokožice prema sjemenki, najviše je šećera u središnjem sloju pulpe, zatim u sloju stanica ispod pokožice, a najmanje u sloju blizu sjemenki. Pri preradi grožđa, najlakše se oslobađa sok iz središnjih slojeva bobice, to je tzv. samotok, a zatim uz pomoć preša i iz ostalih slojeva koji su siromašniji šećerom. Zbog toga se samotok posebno cijeni. Od ostalih šećera u grožđu u malim količinama ima saharoze i pentoza (Perić, 2013.).

2.3.1. Glukoza (grožđani šećer)

Glukoza (grožđani šećer) je najrasprostranjeniji monosaharid u prirodi. Može se naći u krvi i tkivu svih sisavaca, a i u biljnome svijetu, najčešće grožđu, gdje se nalazi slobodna ili u sastavu oligosaharida i polisaharida. Glukoza je heksoza (šećer sa šest C-atoma) i aldoza, jer sadrži aldehidnu skupinu, tj. glukoza je ugljikohidrat monohidrat aldoheksoza. Tisuće molekula glukoze mogu se povezati u mnogo veće molekule celuloze, koje sačinjavaju potporni skelet biljke. Molekule glukoze također se mogu spojiti u velike molekule škroba na nešto drugačiji način. Budući da je glukoza jedinica od koje je izgrađen škrob, celuloza i

glikogen, ona je najčešći i najvažniji monosaharid. U prirodi se vjerojatno nalazi više jedinica glukoze od bilo koje druge organske skupine. Njezina bruto formula glasi $C_6H_{12}O_6$. Glukoza je dominantni izvor energije u organizmu, a dobivanje energije iz nje se odvija u procesu glikolize. U organizmu je, također, moguća i sinteza glukoze iz aminokiselina procesom glukoneogeneze (Morrison i Boyd, 1979.).

2.3.2. Fruktoza

Najvažnija ketoza je fruktoza, koja je vrlo raširena u voću i čini s glukozom disaharid saharozu. Fruktoza najslađa je od svih monosaharida, iako slatkoća varira ovisno o formi. Lako se topi u vodi. U kristalnom obliku, ako se otopi u tekućini, slatkoća se smanjuje. U medu su, na primjer, podjednake količine fruktoze i glukoze. U spoju s drugim spojevima fruktoza se krije u velikom broju oligosaharida (saharozi, rafinozi, inulinu i drugima). Fruktoza u ljudski organizam dospijeva putem hrane. Hidrolizom saharoze u organizmu nastaju glukoza i fruktoza. Fruktoza se kao i glukoza direktno apsorbiraju u krv. Krv je odnosi u jetru gdje dolazi do izomerizacije fruktoze u glukozu, koja se kasnije u stanicama koristi za stvaranje energije. Za razliku od glukoze koje uzrokuju nagle promjene u razini glukoze u krvi, što kod dijabetičara može uzrokovati ometanje metaboličke kontrole, fruktoza se apsorbira mnogo sporije i uzrokuje samo manje promjene u razini glukoze u krvi (Morrison i Boyd, 1979.).

2.3.3. Saharoza

Saharoza je stolni šećer. Od svih kemijskih kemikalija, saharoza se proizvodi u najvećim količinama u čistom obliku. Molekularna formula saharoze je $C_{12}H_{22}O_{11}$, također je nereducirajući šećer. Saharoza je sastavljena od jedinica D-glukoze i D-fruktoze koje su spojene glikozidnom vezom između C-1 glukoze i C-2 fruktoze, jer jedino na taj način može samo jedna veza između dvije jedinice djelotvorno blokirati obje karbonilne skupine. Proces proizvodnje šećera uključuje ekstrakciju šećera iz biljnih šećernih sirovina i u njegovu pročišćavanju. Dok se voćni i grožđani šećer, zbog svoje slabe sposobnosti kristalizacije, proizvode u skromnim količinama, proizvodnja saharoze razvila se u moćnu industriju, a njezin proizvod ima važnu ulogu u suvremenoj ljudskoj prehrani. Iako se u sokovima mnogih biljaka nalazi nešto saharoze, za industrijsku proizvodnju saharoze značajne su samo šećerna

repa i šećerna trska. Šećerna repa uzgaja se u umjerenom klimatskom pojasu i od nje se šećer proizvodi u cijeloj Europi. U Hrvatskoj proizvedene su 240 000 t šećera od šećerne repe te gotovo 60 000 tona od šećerne trske samo u 2016. godini (Morrison i Boyd, 1979.).

2.3.4. Maltoza

Maltoza je disaharid, te produkt koji nastaje tokom proizvodnje slada. Sastoji se od dvije molekule glukoze. Sintetizira se međusobnim povezivanjem dvije molekule glukoze, gdje su monomeri glukoze povezani sa α(1→4) vezama. Maltoza se može proizvesti i iz škroba (na primjer krompirovog) ili žitarica (Morrison i Boyd, 1979.). Maltoza $C_{12}H_{22}O_{11}$, nastaje procesom fermentacije piva, te i tijekom proizvodnje slada(Perić, 2013). Najpoznatiji sladovi od žitarica, kao što su pšenični slad, kukuruzni i ječmeni slad, sadrže velike količine maltoze. Rijetko je prirodni sastojak hrane, ali nastaje kada se raskinu veze između dugih molekula škroba. U epitelnim stanicama crijeva on se s pomoću enzima maltaze hidrolizira u glukozu, koja ulazi u krvni optok i prenosi se u tjelesna tkiva (Morrison i Boyd, 1979.).

2.3.5. Maltotrioza

Maltotrioza, $C_{18}H_{32}O_{16}$, oligosaharid, koji se sastoji do tri molekule glukoze povezane α-1-4 glikozidnim vezama. Zbog svog jednostavnog sastava nastaje razgradnjom škroba i iz nje se daljnjom razgradnjom dobiva maltoza te na kraju glukoza. Djelovanjem amilaze iz sline u usnoj šupljini dolazi do djelomične razgradnje škroba i nastanka maltotrioze, daljnjim djelovanjem enzima dolazi do razgradnje na maltozu te pomoću enzima maltaze nastaje glukoza. Daljnja, odnosno glavna razgradnja se odvija u gornjem dijelu tankog crijeva, djelovanjem α-amilaze. α-amilaza ima glavnu ulogu pri razgradnji škroba a tako i maltotrioze, budući da su jedinice glukoze u oba spoja povezane istim α-1-4 glikozidnim vezama. Maltotrioza se nalazi u različitim biljnim i životinjskim materijalima vezana, dok je rjeđe slobodna (Morrison i Boyd, 1979.).

2.4. Fermentacija na čvrstim nosačima

Procesi razgradnje organskih tvari pomoću mikroorganizma se mogu provoditi u tekućoj podlozi na čvrstoj podlozi. Osnovna razlika između uzgoja na tekućoj (eng. Submerged fermentation, SmF) čvrstoj podlozi (eng. Solid state fermentation, SSF) je u količini slobodne vode (Michell i Berovic, 2006.). Uzgoj na čvrstim nosačima se odvija bez prisutnosti slobodne vode, dok se uzgoj na tekućoj podlozi odvija uz uvjete sa malim udjelima slobodne vode. Oba procesa su aerobna, odvijaju se u prisutnosti kisika, te se odvijaju spontano u prirodi (Raghava Rao i sur., 1993.).

Pri odabiru metode uzgoja mikroorganizama važan aspekt imaju određeni čimbenici koji utječu na sami odabir poželjne metode. Neki od čimbenika su odabir mikroorganizama, odabir podloge, odabir parametara procesa itd. čvrsti nosači za razvoj mogu biti inertni (različiti sintetički materiji), ali i ne-inertni poput lignocelulozno otpada (Panda i sur., 2008.). Prednost fermentacije na čvrstim nosačima u odnosu na submerzni uzgoj je veća produktivnost procesa, niža cijena opreme i proizvodnje, manja potrošnja energije, smanjena količina otpada nakon procesa. Nedostatak ovakvog uzgoja je nemogućnost opskrbe mikroorganizma kisikom, hranjivim tvarima i nedovoljna kontrola procesa (Pandey, 2008.).

Materijali koji su ne-inertni odnosno služe i kao izvor mikro- i makronutrijenata za rast i razvoj mikroorganizama većinom su škrobni, celulozni ili lignocelulozni supstrati, te supstrati koji sadrže topive šećere kao glavni izvor ugljika (komina grejpa, slatki sirak, šećerna repa, otpad od ananasa). Neki od šećernih supstrata su pšenica, ječam, kukuruz, riža i dr., a od škrobnih klasovi kukuruza, pšenice, ječma. Lignocelulozni materijal je biopolimer koji se sastoji od celuloze, hemiceluloze, lignina te je najrašireniji u prirodi. Lignin je polimerna molekula otporna na kemijsku i biokemijsku razgradnju. Gljive mogu razgraditi lignocelulozni materijal kao i većina mikroorganizama (Daâssi i sur., 2016.). S obzirom na to da gljive zahtijevaju prisutnost slobodne vode za svoj rast i razvoj, smatraju se najpogodnijim mikroorganizmom (uz plijesni) za uzgoj u uvjetima SSF (Pandey, 2008.). Gljive bijelog truljenja imaju sposobnost razgradnje širokog raspona komleksnih spojeva. Glavni razlog

toga je što proizvode specifične izvanstanične enzime te stoga, imaju veliku mogućnost razgradnje sastojaka stanične stjenke biljnog materijala (Hadda i sur., 2015.).

Gljive bijelog truljenja razgrađuju specifične aromatske spojeve koji zagađuju okoliš kao što su ksenobiotici, policiklički aromatski ugljikovodici, pesticidi, dioksini te industrijska bojila. Lignolitički enzimi su ligninperoksidaza (LiP), mangan peroksidaza (MnP) i laktaza (Lac). Potpuna razgradnja lignoceluloznog supstrata provodi se hidrolizom strukturalnog polisaharidnog staničnog zida, uz djelovanje različitih enzima kao što su celulaze i hemicelulaze. Za potpunu razgradnju materijala, gljive bijelog truljenja proizvode i druge enzime, esteraze (lipaze) ili proteaze. Isto tako materijal se prevodi u oblik koji bi bio pogodan za daljnju biotehnološku preradu u hranu za životinje ili različite visokovrijedne produkte, kao što su biogoriva (Daâssi i sur., 2016.).

2.5. Ekstrakcija

Ekstrakcija je postupak potpunog ili djelomičnog razdvajanja smjese tvari koje imaju različitu topivost u različitim otapalima. Komponenta iz sastava smjese koja se odjeljuje, obrađuje se selektivnim otapalom tj. otapalom koje otapa isključivo tvar koja se želi izdvojiti ovim postupkom. Ekstrakcija se razlikuje od izlučivanja jer se provodi na organskim tvarima, dok se izlučivanje radi na anorganskim tvarima. Ukoliko se radi o materijalu koji je cjelokupno ili gotovo cjelokupno topiv tada se radi o postupku otapanja (Tomas i sur., 2013.).

Ovisno o fazi iz koje se tvari ekstrahiraju, ekstrakcija se dijeli na:

- Ekstrakcija kruto-tekuće (ekstrakcija otapalom) – prijenos tvari odvija se iz krute faze u tekuću fazu,
- Ekstrakcija tekuće-tekuće – prijenos tvari odvija se iz tekuće u tekuću fazu (Tomas i sur., 2013.).

Prilikom provedbe ekstrakcije, osim pripreme materijala, potrebno je provesti odabir odgovarajućeg otapala za ekstrakciju:

- Selektivnost – ekstrakcijom određene komponente iz smjese nužna je veliku selektivnost otapala radi boljeg iskorištenja,
- Razlika u gustoći – ekstrakt se mora separirati u separatoru, radi dobivanja čiste komponente te je za to razlika u gustoći važna osobina otapala,
- Optimalna površinska napetost – što je površinska napetost manja to je lakši prijenos tvari i energije,
- Viskoznost otapala – što je manja viskoznost otapala to je lakši prijenos tvari i topline,
- Otapalo ne smije biti niti korozivno niti toksično, korozivno u odnosu na uređaje
- Otapalo ne smije biti zapaljivo, otapalo mora imati temperaturu izgaranja 25°C višu od temperature procesa,
- Poželjno je da otapalo ima nisku cijenu,
- Otapalo mora biti kemijski i termički stabilno (Gamse, 2006.).

Ekonomičnost procesa ovisi o sljedećim čimbenicima:

- Materijal za ekstrakciju se mora prije procesa pripremiti, usitniti, kako bi vrijeme otapanja bilo što je moguće kraće. Usitnjavanje podrazumijeva mljevenje, rezanje, sjeckanje i slične procese,
- Ekstrakcija isključivo željene tvari se postiže odabirom odgovarajućeg otapala i optimalne temperature,
- Ekstrakt treba sadržavati što veću koncentraciju ekstrahirane komponente (Gamse, 2006.).

Nakon ekstrakcije, ženjene tvari iz otapala se odvajaju drugim jediničnim operacijama kao što su isparavanje, ekstrakcija drugim otapalom, rektifikacijom, kristalizacijom ili nekim drugim postupkom. Svrha odvajanja otapala je dobivanje što čistije ekstrahirane tvari, te ponovna uporaba otapala za ekstrakciju, ukoliko postoji mogućnost za to (Gamse, 2006.).

2.5.1. Ekstrakcija kruto-tekuće

Ekstrakcije kruto-tekuće je postupak kojom se jedna ili više tvari odjeljuje iz krutog materijala pomoću tekućeg otapala. Smjesa otapala i ekstrahirane tvari naziva se ekstrakt. Ovaj tip ekstrakcije se primjenjuje najčešće pri ekstrakciji biljnog materijala. Kruto-tekuća ekstrakcija se provodi kao maceracija, perkolacija ili digestija. Maceracija se provodi sa fino usitnjenima koji se potapa u tekuće otapalo, te se drži suspendirano unutar otapala i provodi šaržno. Perkolacija se odvija iz komadnog materijala bez prethodnog usitnjavanja. Sami proces se odvija tako da se u tankom sloju otapalo prevodi preko krutog materijala. Postupak se odvija polušaržno (Veljković i Milenović, 2002.).

Ekstrakcija krutih tvari se provodi pomoću čistog otapala ili nezasićenom otopinom topive tvari koja se ekstrahira. U prehrambenoj industriji koriste se voda, organska otapala (heksan, cikloheksan, metanol i dr.), te superkritični fluidi (ugljikov dioksid, butan…)(Tomas i sur., 2013.).

Prijenos mase u kruto-tekućoj ekstrakciji se odvija kroz dvije faze:

- brza ekstrakcija – otapanje ekstraktivnih tvari sa površine čvrstog materijala
- spora ekstrakcija – difuzija tvari iz unutrašnjosti prema površini i prijenos u otapalo (Veljković i Milenović, 2002.).

Proces uključuje operacije miješanja krute faze i tekuće faze, vrijeme međusobnog kontakta faza, te separacija. Separacija podrazumijeva taloženje, dekantiranje, filtriranje te centrifugiranje.

2.6.Kromatografske metode u analizi uzorka

Kromatografija je metoda (fizikalna) separacije kojom se komponente razdvajaju između dvije faze, od kojih je jedna faza stacionarna, a druga faza pokretna. Odnosno, uzorak je otopljen u pokretnoj (mobilnoj) fazi kao što je tekućina, plin ili fluid pri superkritičnim uvjetima. Takva, mobilna faza se kreće uzduž nepokretne faze. Nepokretna faza može biti

postavljena u koloni ili na ravnoj plohi, te se stoga kromatografija s obzirom na oblik kromatografske podloge dijele na kolonsku i plošnu kromatografiju.

Drugi tip podjele kromatografije je s obzirom na tip fizikalnog stanja pokretne faze. Na osnovu ove podjele razlikujemo: plinsku kromatografiju (GC), tekućinsku kromatografiju (LP, HPLC) i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima. Odnos mobilne i stacionarne faze odabire se na način da se postigne razdvajanje komponenti ispitivanog uzorka do željenog stupnja. Iz navedenog jasno je da se tekućinska kromatografija može provoditi i kolonski i plošno, dok se plinska kromatografija pri superkritičnim uvjetima može provoditi jedino kolonskom kromatografijom. U plinskoj kromatografiji pokretna faza naziva se i plin nosioc, dok se u tekućinskoj pokretna faza zove i eluent (Cerjan-Stefanović i sur., 1999.).

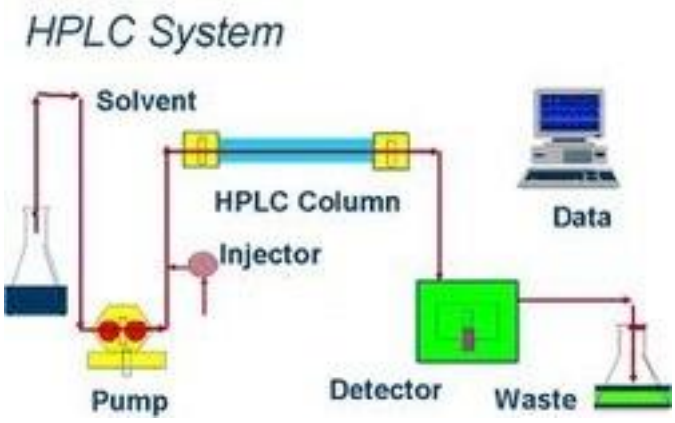
Tekućinska kromatografija kao separacijska tehnika se primjenjuje u biološkim znanostima kao što su analitička ili preparativna kemija. Tekućinska kromatografija se primjenjuje uglavnom za razdvajanje širokog raspona molekula kao što su polimeri, peptidi, proteini i dr. (Cindrić i sur., 2009.).

Prvi opisani proces kromatografije se veže za ruskog botaničara Mikhail Tswett početkom 20. stoljeća. Poboljšavanjem metode provedeno je ranih 70-tih godina, smanjenjem čestica te uvođenjem crpki za potiskivanje pokretne faze. Ovim poboljšanjem metode povećana je učinkovitost i tlak unutar sustava, te je uobičajeni naziv za ovu metodu visoko djelotvorna tekućinska kromatografija (HPLC) i ona je najčešće korištena separacijska metoda kromatografije. S obzirom na polarnost mobilne i stacionarne faze, HPLC metoda se dijeli na:

- kromatografija normalnih faza – stacionarna faza je polarna dok je mobilna faza nepolarna (tijekom procesa iz kolone prvo izlaze najmanje polarne molekule, dok se najlakše otapaju u mobilnoj fazi)
- kromatografija obrnutih faza – stacionarna faza je nepolarna, a mobilna faza polarna (iz kolone prvo izlaze polarne molekule, jer se najbolje otapaju u mobilnoj fazi)(Cerjan-Stefanović i sur., 1999.).

Uređaj za visoko djelotvornu tekućinsku kromatografiju (HPLC) prikazan je na ***Slici 2.*** i sastoji se od:

- rezervoara, crpke, injektora, kolone, detektora i računala (pisača)



Slika 2. Shematski prikaz HPLC sustava

Uređaj sadrži jedan ili više rezervoara koji su najčešće od stakla. Dobava mobilne faze se provodi crpkom. Za unošenje mobilne faze u kolonu koristi se injektor. Najčešća duljina kolone je oko 10-30 cm sa unutarnjim promjerom 4-10 mm, izrađene od različitih materijala (staklo, nehrđajući čelik). Nakon odjeljivanja komponenta zajedno s mobilnom fazom odlazi u ćeliju detektora. Detektor daje određeni odziv u ovisnosti o vremenu zadržavanja komponente u koloni i koncentraciji (Cerjan i sur., 1999.). Odziv koji daje detektor se bilježi na računalu u obliku kromatografskog pika. Kromatogram je skup zabilježenih kromatografskih pikova (Nollet i Toldrá, 2013.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj biološke obrade tropa grožđa na koncentraciju pojedinih šećera u vodenim ekstraktima. Biološka obrada provedena je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* tijekom 15 dana.

3.2. Materijali i metode

3.2.1 Materijali

Istraživanja su provedena na tropu crnog grožđa koji zaostao nakon proizvodnje crnog vina, a sastojao se od kožica, sjemenki s primjesama peteljki i pulpe. Trop grožđa skladišten je do početka provedbe diplomskog rada u laboratorijskom zamrzivaču na -20 °C. Prije biološke obrade zamrznuti trop se rastresao i ostavio stajati na sobnoj temperaturi oko 1 sat radi lakše daljnje obrade, te je potom grubo usitnjen u blenderu (HR 2860, Philips). Biološka obrada tropa grožđa provedena je pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* TV6. Kulture su uzgajane sedam dana na krumpirovom agaru (PDA) (BiolifeItaliana Sr.L. Viale Monza, Milan, Italy) pri 27 °C.

3.2.2. Biološka obrada tropa grožđa pomoću *Trametes versicolor*

U laboratorijske staklenke odvagano je 50 g tropa grožđa u koji je dodano 30 mL vode budući da *T. versicolor* za svoj rast zahtjeva određeni udio vlage (70-90%). Nakon 1 dana kondicioniranja na sobnoj temperaturi uzorci su sterilizirani i ohlađeni. Nakon toga, uzorci su nacijepljeni gljivom bijelog truljenja, odnosno provedena je inokulacija s 5 micelijskih diskova kulture *T. versicolor* promjera 5 mm koji su, raspršeni u 10 mL sterilizirane vode koja je potom dodana supstratu. Uzorci su inkubirani na 27°C tijekom 15 dana te je provedeno periodično uzorkovanje svaki dan u dva vremenska intervala u razmaku od 10 – 12 sati tj. u 8:00 sati i 18:00 sati.

Nakon vađenja uzoraka iz inkubatora ponovo je provedena sterilizacija uzorka u autoklavu

(121°C/20min) kako bi se zaustavio rast *T. versicolor*. Uzorkovanje je provođeno u tri paralele. Slijepa proba pripremljena je na isti način kao i uzorci ali bez nacjepljivanja *T. versicolor*. Svaki je uzorak nakon fermentacije i sterilizacije, osušen na zraku (za 48 sati na sobnoj temperaturi) te usitnjen u ultracentrifugalnom mlinu (Retsch ZM200) (***Slika 3.***)na veličinu čestica od 1 mm, te nakon toga podvrgnut određivanju udjela suhe tvari i ekstrakciji šećera.

3.2.3. Određivanje suhe tvari

Udio suhe tvari određen je u uzorcima prije i nakon obrade i *T. versicolor*. Određivanje suhe tvari provedeno je sušenjem ispitivanog uzorka tropa grožđa termogravimetrijskom metodom na uređaju za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo) prikazanim na ***Slici 4.*** Prije određivanja udjela suhe tvari tropa grožđa je osušen na zraku pri sobnoj temperaturi i fino usitnjen na mlinu (Retsch ZM200), ***Slika 3***. Ispitivani uzorak stavljen je na aluminijsku pliticu (oko 2 g), koja je postavljena direktno na integriranu vagu u komoru za sušenje, gdje se sušenje provodi do konstantne mase. Uvjeti sušenja su: standardna metoda, temperatura sušenja 105°C i kriterij završetka procesa (eng. Switch-off 3: gubitak mase od 1 g u 50 s) (Planinić i sur., 2003.). Određivanje suhe tvari provedeno je u dva ponavljanja.



Slika3. Ultracentrifugalni mlin Retsch ZM200



Slika 4. Mettler Toledo HR 73

3.2.4. Kruto-tekuća ekstrakcija šećera iz tropa grožđa

Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji s tresilicom (Julabo SW-23, Njemačka) (***Slika 5.***) koja je namijenjena za laboratorijsku upotrebu te ima mogućnost podešavanja temperature (od 20 do 99,9 °C), vremena trešnje (od 1 min do 10 h) i frekvencije trešnje (od 20 do 200rpm).



Slika 5. Vodena kupelj za ekstrakciju s tresilicom (Julabo SW-23)

3.2.5. Provedba kruto-tekuće ekstrakcije šećera iz tropa grožđa

Postupak ekstrakcije je proveden na način da je u staklene tikvice je odvagano oko 1 g usitnjenog uzorka te je dodano 25 mL vode. Tikvice s uzorkom i otapalom postavljene su u vodenu kupelj gdje je ekstrakcije provedena pri temperaturi 30°C, vremenu od 30 min i broju okretaja tresilice od 170 rpm. Ekstrakcija svakog uzorka provedena je u dva ponavljanja.

3.2.6. Priprema ekstrakta za analizu

Poslije provedenog postupka ekstrakcije, suspenzije uzorka i otapala je centrifugirana (Multifuge 3L-R Centrifuge, Heareus) pri 10 000 g tijekom 10 minuta. Dobiveni supernatant je korišten za određivanje koncentracije šećera tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.

3.2.7. Određivanje koncentracije šećera u ekstraktima tropa grožđa

Određivanje koncentracije šećera u prethodno pripremljenom uzorku je provedeno tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (Nexera XR UHPLC, Shimadzu) (***Slika 6.***). Uređaj,prikazan na slici, se sastoji od vakuum otplinjača (DGU–20A_{5R}), dvije binarne pumpe (A & B) (LC–20ADXR), automatskog uzorkivača (SIL–20ACXR), kolonske pećnice (CTO-20AC), PDA detektora (SPD–M20A), detektora indeksa loma (RID-20A), kontrolera (CBM–20A) te PC-a i odgovarajućeg softvera za upravljanje i obradu podataka (Lab Solution).



Slika 6. Nexera XR UHPLC, Shimadzu

Koncentracije pojedinačnih šećera u uzorcima su analizirani izokratnom metodom (Šibalić, 2016.), kromatografijom normalnih faza prema navedenim uvjetima u **Tablici 6.**

Tablica 6: UHPLC metoda određivanja koncentracije šećera u ekstraktima tropa grožđa

Kolona	**InertSustain NH_2**
Mobilna faza	acetonitril : voda = 75 : 25
Vrijeme analize	20 min
tlak	40 bar
Temperatura kolonske pećnice	40°C
Protok mobilne faze	1 mL/min
Volumen injektiranja uzorka	10 µL
Detektor	Detektor indeksa refrakcije(RID – A)

Prije provedene analize šećera uzorci su profiltrirani na membranskom filtru promjera 0,22 µm u viale koje su potom stavljene u automatski uzorkivač. Za otplinjavanje mobilne faze korištena je ultrazvučna kupelj (Elmasonic P 120 H, Elma).

Dobiveni kromatogrami korišteni su za kvalitativnu i kvantitativnu analizu šećera u uzorcima. Kvalitativna analiza (identifikacija komponenti) je provedena usporedbom retencijskih vremena pojedinačnih šećera u uzorku s retencijskim vremenima nakon injektiranja poznatog standarda šećera određene koncentracije u uzorku. Kvantitativna analiza šećera u uzorcima provedena je pomoću odgovarajućeg softvera za obradu podataka (*Lab Solution*), određivanjem površine ispod pikova na temelju prethodno izrađenih kalibracijskih krivulja (glukoza, fruktoza, saharoza, maltotrioza, maltoza, manoza, riboza, ksiloza). Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih šećera određena je u tri ponavljanja.

4. REZULTATI

Eksperimentalno dobiveni podaci koncentracija identificiranih i kvantificiranih šećera (glukoza, fruktoza, saharoza, maltoza i maltotrioza) u vodenim ekstraktima biološki obrađenog tropa grožđa (tijekom 15 dana) kao i standardna devijacija prikazani su u dijagramima.

4.1. Određivanje suhe tvari

Suha tvar određena je u uzorku prije te u uzorcima nakon biološke obrade tropa pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor*. Određivanje je provedeno nakon sterilizacije uzoraka i sušenja na zraku tijekom 48 sati. Vrijednosti suhe tvari za slijepu probu (sp) te uzorke koji su uzorkovani u 8 h i 18 h prikazane su u **Tablici 7**.

Tablica 7: Udio suhe tvari u uzorcima tropa grožđa

Sr. vrijednost	Suha tvar %
1 dan/sp	92,83
1 dan/8h	92,07
1 dan/18h	92,22
2 dan/sp	92,07
2 dan/8h	92,16
2 dan/18h	92,11
3 dan/sp	92,79
3 dan/8h	92,54
3 dan/18h	92,17
4 dan/sp	92,44
4 dan/8h	92,24
4 dan/18h	91,94
5 dan/sp	92,02
5 dan/8h	91,56
5 dan/18h	91,52
6 dan/sp	92,06
6 dan/8h	91,59
6 dan/18h	91,69
7 dan/sp	92,61
7 dan/8h	91,78
7 dan/18h	91,65
8 dan/sp	92,52
8 dan/8h	91,75
8 dan/18h	91,77
9 dan/sp	92,66
9 dan/8h	92,29

9 dan/18h	92,01
10 dan/8h	91,87
10 dan/18h	91,65
11dan/8h	91,50
11 dan/18h	91,44
12 dan/8h	91,76
12 dan/18h	91,82
13 dan/sp	92,79
13 dan/8h	91,79
13 dan/18h	91,78
14 dan/sp	92,58
14 dan/8h	92,18
14 dan/18h	91,78
15 dan/sp	92,56
15 dan/8h	92,04
15 dan/18h	92,02

4.2. Izračunavanje masenog udjela pojedinačnih šećera u ekstraktima grožđanog tropa

Prema baždarnim krivuljama za identifikaciju šećera (Šibalić, 2016.) izračunate su koncentracije šećera u mg/mL koje su potom preračunate na suhu tvar uzorka prema navedenom izrazu:

$$C = \frac{c \cdot V_e}{m_{uz} \cdot w_{s.t.}} \cdot 100$$

C – maseni udio analizirane tvari u ekstraktu (mg/$g_{s.t.}$)

c – maseni koncentracija analizirane tvari u ekstraktu (mg/mL)

V_g – ukupni volumen dobivenog ekstrakta (mL)

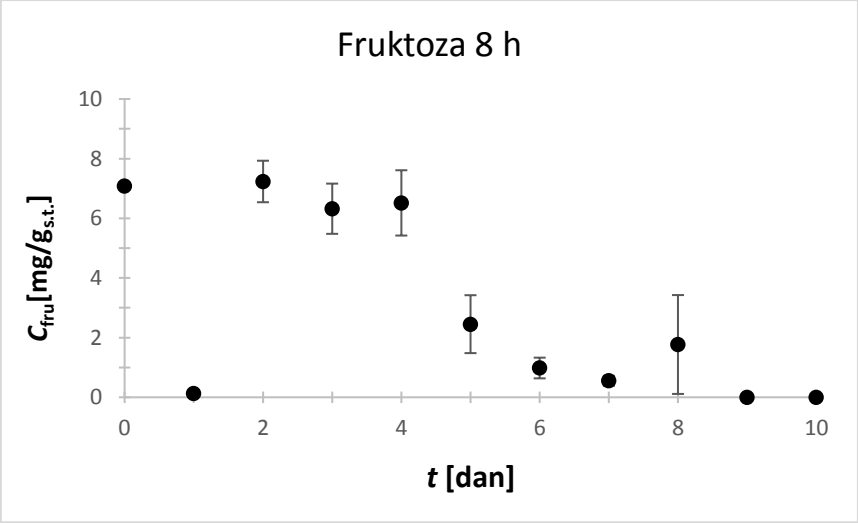
m_{uz} – masa uzorka (g)

$w_{s.t.}$ – udio suhe tvari u uzorku (%)

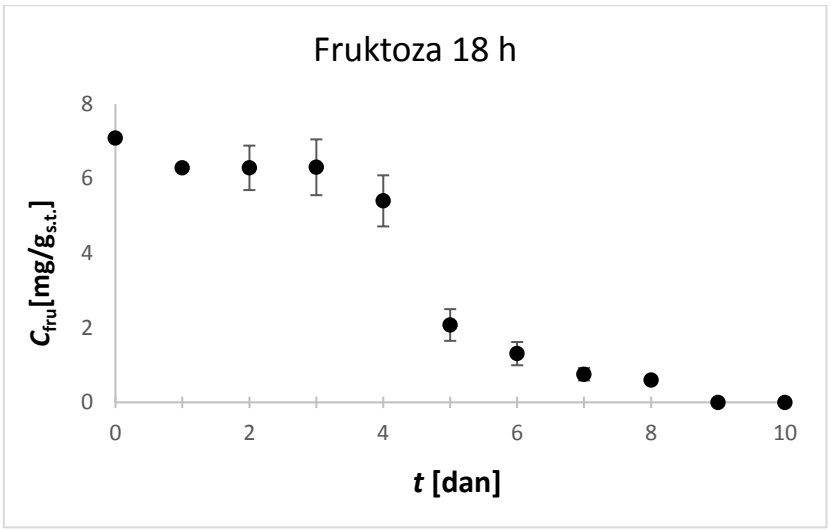
4.3. Maseni udio pojedinačnih šećera u ekstraktima grožđanog tropa

U ovom poglavlju prikazani su dijagrami s eksperimentalnim podacima za identificirane i kvantificirane šećere (fruktozu, glukozu, saharozu, maltozu i maltotrioz) u ekstraktima neobrađenog i obrađenog tropa grožđa pomoću gljive bijelog tuljenja *T. versicolor*. Analize su provedene u tri ponavljanja te su prikazane srednje vrijednosti sa standardnom devijacijom podataka.

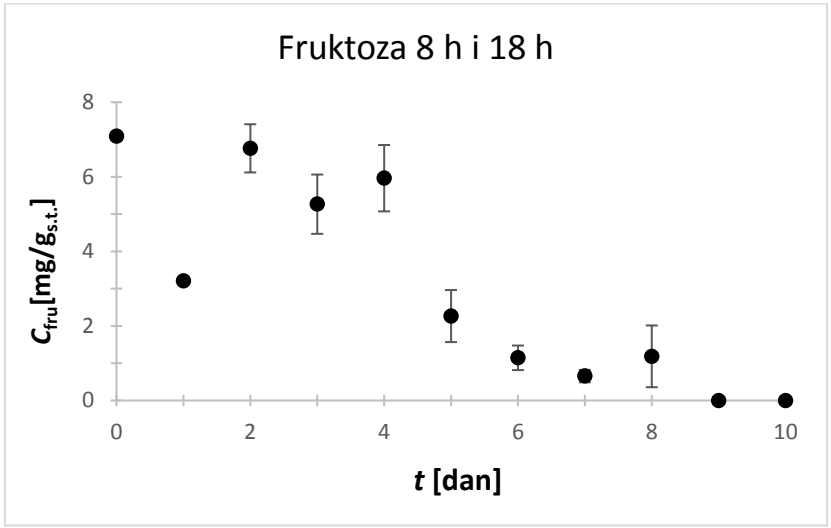
Za svaki kvantificirani šećer prikazani su podaci u tri dijagrama: rezultati uzorkovanja u 8 h, 18 h i prosječna vrijednost koncentracije šećera za svaki dan tijekom 15 dana fermentacije.



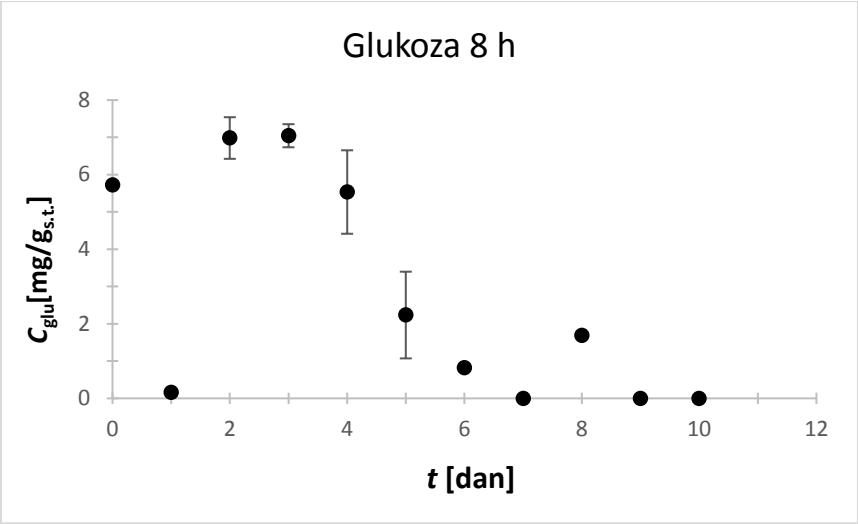
Slika 7. Srednje vrijednosti masenog udjela fruktoze u ekstraktima biološki obrađenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*) za uzorkovanje u 8 h



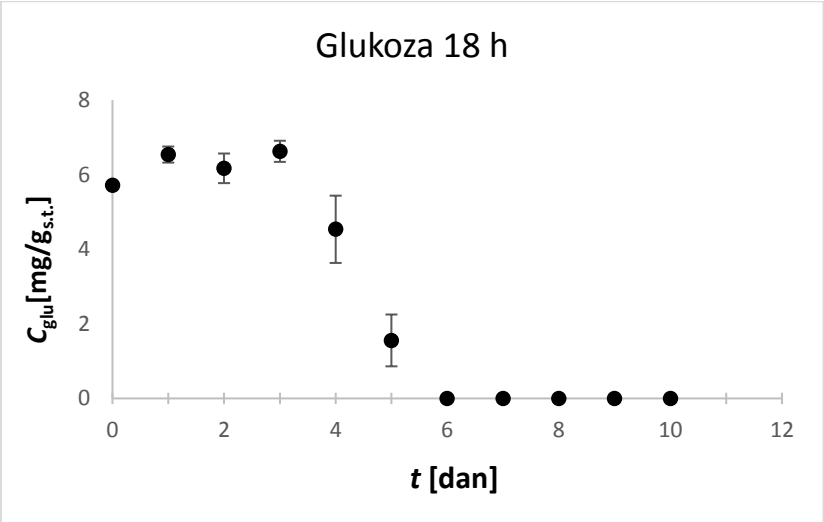
Slika 8. Srednje vrijednosti masenog udjela fruktoze u ekstraktima biološki obrađenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*) za uzorkovanje u 18 h



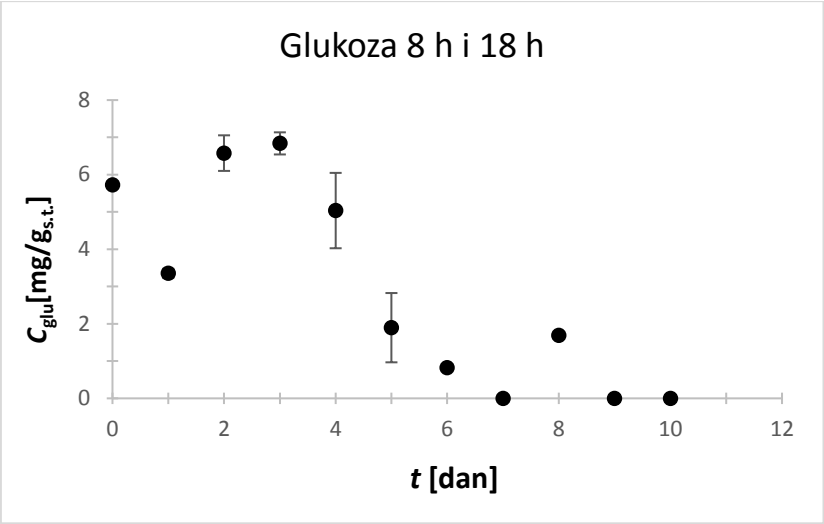
Slika 9. Srednje vrijednosti (od uzorkovanja u 8 h i 18 h) masenog udjela fruktoze u ekstraktima biološki određenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*)



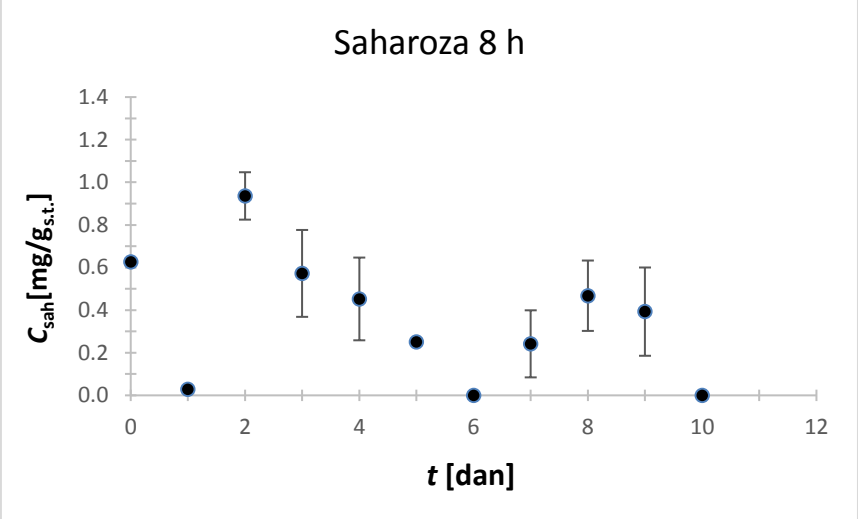
Slika 10. Srednje vrijednosti masenog udjela glukoze u ekstraktima biološki obrađenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*) za uzorkovanje u 8 h



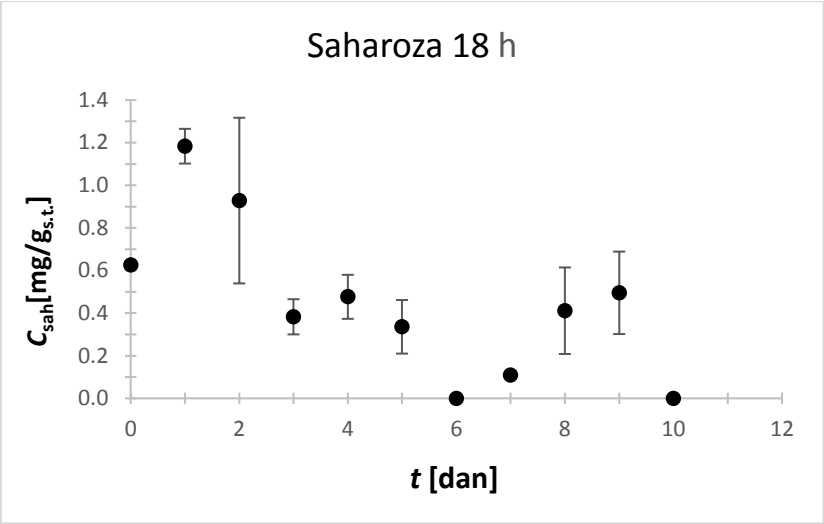
Slika 11. Srednje vrijednosti masenog udjela glukoze u ekstraktima biološki obrađenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*) za uzorkovanje u 18 h



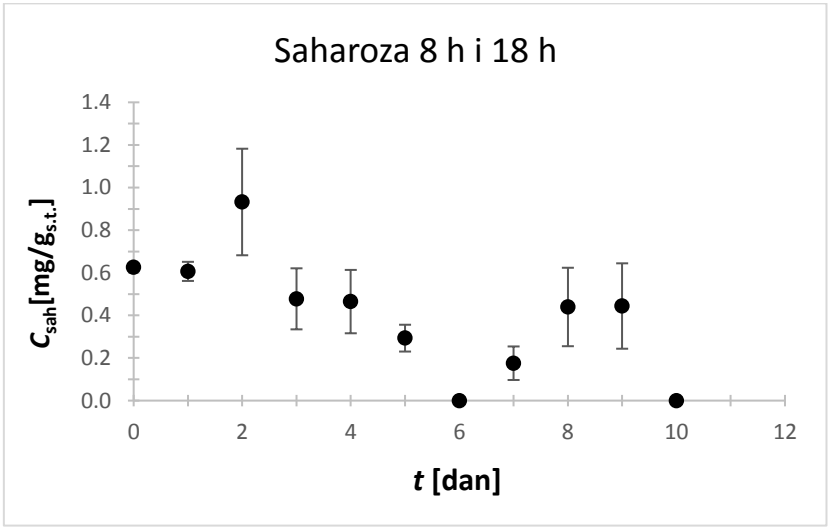
Slika 12. Srednje vrijednosti (od uzorkovanja u 8 h i 18 h) masenog udjela glukoze u ekstraktima biološki određenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*)



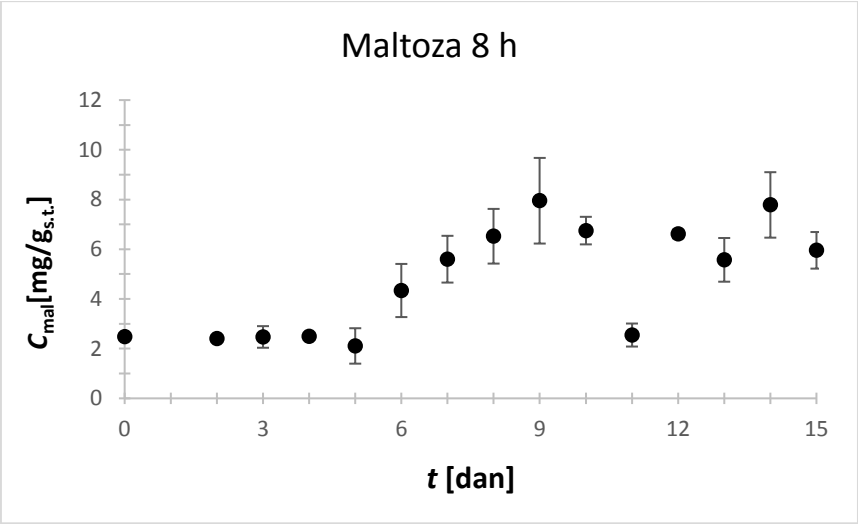
Slika 13. Srednje vrijednosti masenog udjela saharoza u ekstraktima biološki obrađenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*) za uzorkovanje u 8 h



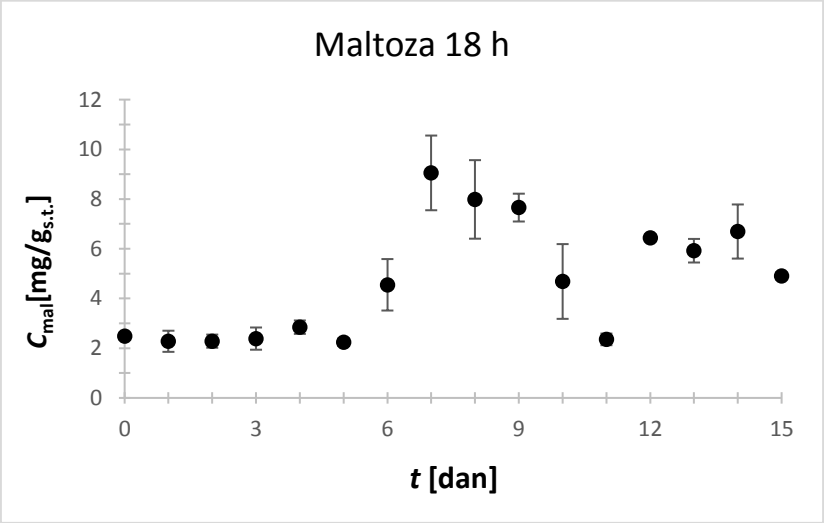
Slika 14. Srednje vrijednosti masenog udjela saharoze u ekstraktima biološki obrađenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*) za uzorkovanje u 18 h



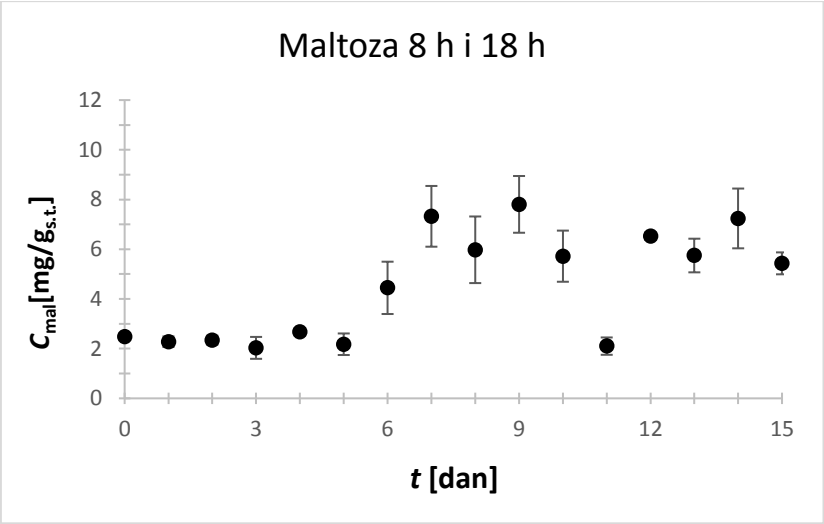
Slika 15. Srednje vrijednosti masenog udjela (od uzorkovanja u 8 h i 18 h) saharoze u ekstraktima biološki određenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*)



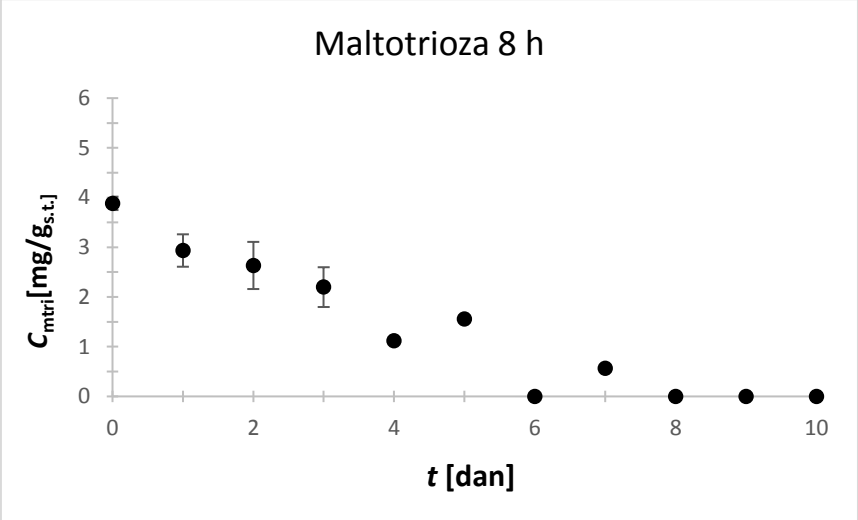
Slika 16. Srednje vrijednosti masenog udjela maltoze u ekstraktima biološki obrađenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*) za uzorkovanje u 8 h



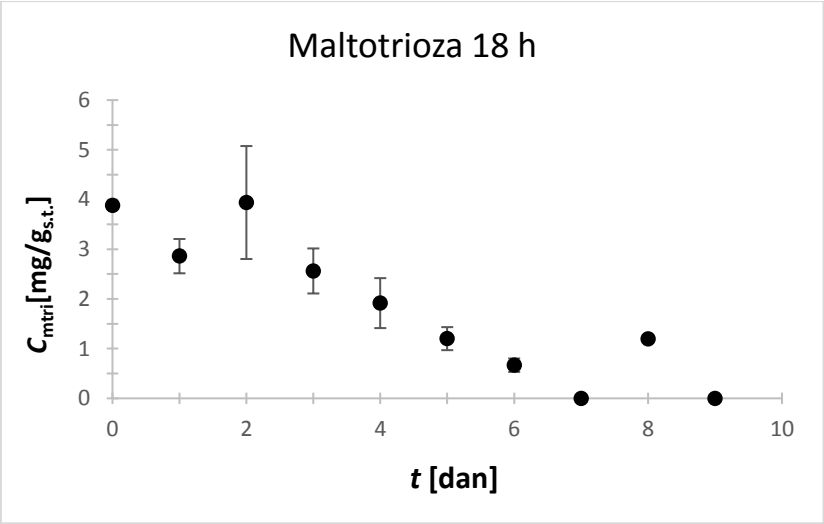
Slika 17. Srednje vrijednosti masenog udjela maltoze u ekstraktima biološki obrađenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*) za uzorkovanje u 18 h



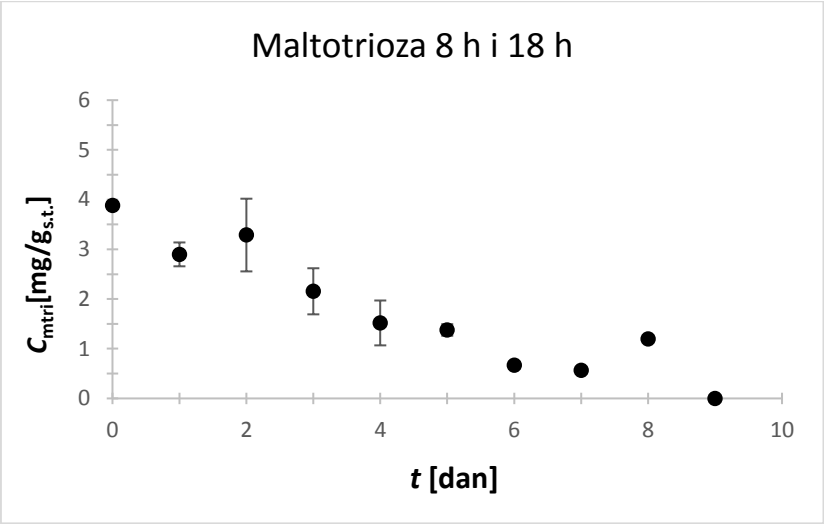
Slika 18. Srednje vrijednosti masenog udjela (od uzorkovanja u 8 h i 18 h) maltoze u ekstraktima biološki određenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*)



Slika 19. Srednje vrijednosti masenog udjela maltotrioze u ekstraktima biološki obrađenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*) za uzorkovanje u 8 h



Slika 20. Srednje vrijednosti masenog udjela matotrioze u ekstraktima biološki obrađenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*) za uzorkovanje u 18 h



Slika 21. Srednje vrijednosti masenog udjela (od uzorkovanja u 8 h i 18 h) matotrioze u ekstraktima biološki određenog grožđanog tropa u ovisnosti o vremenu fermentacije na čvrstim nosačima (*t*)

5. RASPRAVA

U ovom radu provedena je biološka obrada tropa grožđa pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u trajanju 15 dana. Uzorci su uzimani svakog dana u 8 h ujutro i 18 h navečer te su ekstrahirani pri uvjetima(30°C, 30min, 170 rpm, omjer kruto tekuće 25 mL/g) koji su u ranijim istraživanjima pokazani kao optimalni za ekstrakciju šećera iz biljnog materijala (Šibalić, 2016.). U ekstraktima je određivana koncentracija prisutnih šećera UHPLC- metodom s ciljem praćenja promjene koncentracije šećera, uslijed razgradnje supstrata i zbog njihove važnosti u proizvodnji biogoriva (bioetanol i bioplin). Naime, trop grožđa osim jednostavnih fermentabilnih šećera, glukoze i fruktoze te disaharida saharoze sadrži i četiri glavna polisaharida, celulozu koja se sastoji od podjedinica glukoze, hemicelulozu koja se sastoji od jedinica glukoze, manoze, xyilana i arabinoze, škrob (podjedinice glukoze) i pektin (podjedinice D-galakturonske kiseline). Složeni šećeri su često inkorporirani u kompleksnu strukturu s ligninom te da bi bili dostupni za razgradnju do jednostavnih šećera treba biti provedena razgradnja lignina. Gljive bijelog truljenja pomoću svojih ekstracelularnih enzima (oksidaza) imaju mogućnost razgradnje biljnog polimera lignina koji okružuje celulozu i hemicelulozu te omogućava dostupnost celuloze i hemiceluloze različitim hidrolazama koji ih dalje hidroliziraju do monosaharida. Razgradnja složenih šećera je bitna i zbog činjenice da lignin kao jedini izvor ugljika nije dovoljan za rast gljiva bijelog truljenja, dok su hemiceluloza i celuloza pravi izvor ugljika i energije (Ward i sur., 2004.). Udio pojedinačnih šećera izražen je na suhu tvar koja se za ispitivane uzorke tropa grožđa kretala u rasponu od 91,44 % - 92,83% (**Tablica 7**).

Osim u biološki obrađenim uzorcima, analize određivanja šećera provedene su i u uzorku koji nije obrađen s gljivom bijelog truljenja (slijepa proba) te su ekstraktima identificirani i kvantificirani slijedeći šećeri: fruktoza, glukoza, maltortioza, maltoza i saharoza u koncentracijama kako slijedi: 7,09; 5,72; 3,88; 2,48 i 0,63 mg/$g_{s.t.}$ (**Slike 7**, **10**, **13**, **16** i **19**).

Za sve identificirane šećere prikazani su posebni dijagrami za uzorkovanje u 8 h i 18 h te prosječne vrijednosti koncentracija za svaki dan fermentacije. Cilj uzorkovanja svakih 12 sati je bio da se dobije bolji uvid u potrošnju prisutnih i novonastalih šećera uslijed mikrobiološke razgradnje supstrata. Prvi uzorak nakon inokulacije je uzet nakon 12 sati fermentacije i tu je još nije izražen jasan trend ovisnosti koncentracije pojedinog šećera o trajanju fermentacije posebice u slučaju prvog uzorkovanja biološki obrađenog uzorka (**Slike 7**, **10**, **13**, **16** i **19**). Razlog tome može biti duža faza (lag faza) prilagodbe mikroorganizma na novonastale uvjete nakon inokulacije supstrata. Naime na početku fermentacije na čvrstim nosačima se supstrat

inokulira s mikroorganizmom, a pri tome supstrat sadrži uglavnom krute čestice škroba, celuloze, minerala i drugih mikro i makro nutrijenata. Mikroorganizam se na početku zadržava s vanjske površine čestica supstrata pri čemu sporo raste, razmnožava se i polako prodire u mikro i makro pore supstrata, a pri tome koristi dostupne izvore energije npr. jednostavne šećere nastale iz hidrolize škroba (Raghava Rao i sur., 1993.). Međutim, već nakon 24 sata se uočava jasniji trend pada odnosno rasta koncentracija šećera.

Iz prikazanih dijagrama vidljivo je da prvih 7 dana trajanja fermentacije dolazi do potpunog smanjenja koncentracije sljedećih šećera: fruktoze (**Slike 7-9**), glukoze (**Slike 10-12**), saharoze (**Slike 13-15**) i maltotrioze (**Slike 19-21**). Pretpostavka je da gljiva bijelog truljenja tijekom svog rasta prvo troši slobodne monosahrade i da ima najveći afinitet prema glukozi (Tišma, 2010.)budući da je sva prisutna glukoza potrošena tijekom prvi 6-7 dana (koncentracija glukoze se smanjila s početnih 5,72 mg/$g_{s.t.}$ na prosječno 0,82 mg/$g_{s.t.}$ šesti dan), a fruktoza tek nakon 9 dana fermentacije (koncentracija fruktoze se smanjila s početnih 7,09 mg/$g_{s.t.}$ na prosječno 1,14 mg/$g_{s.t.}$ šesti dan). Istodobno s glukozom i fruktozom smanjivala se koncentracija saharoze i maltotrioze. U slučaju saharoze (**Slike 13-15**) vidljivo je da se u potpunosti potrošila nakon šest dana fermentacije što upućuje na prisutnost enzima invertaze u tropu grožđa koji hidrolizira saharozu na jedinice fruktozu i glukozu (od kojih se sastoji). Nastale šećere, glukozu i fruktozu, gljiva bijelog truljenja odmah troši za svoj rast što potvrđuje i njihovo odsustvo u ekstraktima nakon devetog dana fermentacije. Uočava se jedino mali porast koncentracije navedenih šećera 8 dan fermentacije što vjerojatno odgovara trenutku razgradnje saharoze na svoje podjedinice. Koncentracija saharoze se nakon 6-9 dana povećavala (sa prosječno 0,18 mg/$g_{s.t.}$ na 0,44 mg/$g_{s.t.}$), a potom deseti dan potpuno potrošila. Iz navedenog je evidentno da je došlo do razgradnje određenih složenih šećera, pri čemu se oslobodila saharoza koje se potom razgradila na fruktozu i glukozu.

Naime, poznato je da se nakon potrošnje jednostavnih šećera mikroorganizmi luče enzime koji razgrađuju polisaharide na jednostavne šećere koje onda mikroorganizam dalje troši za svoj rast. Na taj način se odvija uravnotežena razgradnja složenih ugljikohidrata što je bitno za optimalan i rast i razvoj mikroorganizama. Velika enzimska razgradnja polisaharida bi utjecala na zaustavljanje aktivnosti mikroorganizama (inhibicija enzima supstratom) (Raghava Rao i sur., 1993.).

Slike 19-21 pokazuju da se koncentracija maltotrioze smanjivala tijekom prvih 7 dana (koncentracija maltrotioze se smanjila s početnih 3,88 mg/$g_{s.t.}$ na prosječno 0,56 mg/$g_{s.t.}$), a istodobno je uočeno da se koncentracija maltoze (**Slike 16-18**) nakon prvih pet dana nije značajno mijenjala (20,03-2,48 mg/$g_{s.t.}$), te se počela povećavati od šestog dana pri čemu svoj maksimum postiže sedmi dan (9,06 mg/$g_{s.t.}$). Nakon toga koncentracija maltoze se ponovo smanjuje do 11 dana te potom raste. Iz navedenog može se pretpostaviti da se maltotrioza koja je oligosaharid sastavljena od tri molekule glukoze povezane α-1-4 glikozidnim vezama, razgradila na jednostavnije podjedinice maltozu i glukozu, što se vidi iz porasta koncentracije maltoze.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka te statističke obrade istih doneseni su sljedeći zaključci:

- najzastupljeniji šećer u analiziranim ekstraktima biološki neobrađenog tropa grožđa bila je fruktoza (7,09 mg/$g_{s.t.}$), a potom su slijedile glukoza (5,72 mg/$g_{s.t.}$), maltotrioza (3,88 mg/$g_{s.t.}$), maltoza (2,48 mg/$g_{s.t.}$) i saharoze (0,63 mg/$g_{s.t.}$).
- praćenjem koncentracije pojedinih šećera u ekstraktima biološki obrađenog tropa grožđa tijekom 15 dana pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* utvrđeno je da se najznačajnije promjene u koncentraciji promatranih šećera događaju u prvih 6-7 dana fermentacije.
- Nakon šestog dana inkubacije došlo je do smanjenja masenog udjela fruktoze koji je iznosio prosječno 0,75 mg/$g_{s.t.}$, glukoze 0,82 mg/$g_{s.t.}$, saharoze 0,00 mg/$g_{s.t.}$ i maltotrioze 0,67 mg/$g_{s.t.}$, dok je maseni udio maltoze bio približno konstantan tijekom prvih 5 dana te se nakon šestog dana povećavao sve do devetog dana fermentacije (7,90 mg/$g_{s.t.}$).
- Rezultati pokazuju da gljiva bijelog truljenja (*T. versicolor*) ima sposobnost razgradnje strukture tropa grožđa uslijed sekrecije izvanstaničnih enzima tijekom fermentacije pri čemu oslobađaju monosaharidi, disaharidi i oligosaharidi koji su gradivne jedinice polisaharida vezanih u kompleksnim strukturama s ligninom, a koji su neophodni u proizvodnji nekih korisnih produkata npr. biogoriva.

7. LITERATURA

Agencija za plaćanje u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju: *Vinogradarski registar* http://www.apprrr.hr/vinogradarski-registar-1128.aspx [20.02.2017.].

Altman A: *Agricultural biotechnology*. Marcel Dekker, Inc.,New York, 1998.

Bruce A, Palfreyman JW: *Forest products biotechnology*. Taylor & Francis LTD., London, 1998.

Cerjan-Štefanović C, Drevenkar V, Jurišić B, Medić- Šarić M, Petrović M, Šegudović N, Švob V, Turina S: *Kromatografsko nazivlje*. HINUS i sekcija za kromatografiju HDKI, Zagreb, 1999.

Cindrić M, Marković A, Horvatić A: *Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar mase: osnovne metodologije i primjene*. Institut „Ruđer Bošković“, Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za sistemsku biomedicinu, Zavod za biokemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2009.

Daâssi D, Zouari-Mechichi H, Belbahri L, Barriuso J, Martínez MJ, Mechichi MNT: *Phylogenetic and metabolic diversity of Tunisian forestwood – degrading fungi: a wealthof novelties and opportunities for biotechnology*. 3 Biotech 6(1):46, 2016

Gadd GM: *Fungi in bioremediation*. Press Syndicateofthe University of Cambridge, Cambridge 2001.

Gamse T: *Extraction Department of Chemical Engineering and Environmental Technology*. Graz University of Technology, 2006.

Hadda M, Djamel C, Akila O: Screening of Extracellular Enzyme Activities of Ganoderma and Fomes Species Collected from North East Algeria. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* Page No. 1455, 2015.

Korkie LJ, Janse BJH, Viljoen-Bloom M: *Utilising Grape Pomace for Etanol Production*, South African Journal for Enology and Viticulture, 23:31-26, 2002.

Lankinen P: *Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi Agaricusbiosporus and Phlebia radiata on lignocellulose containing media*. Academic Disertationin Microbiology, Helsinki, 2004.

Mitchell DA, Krieger N, Berovič M: *Solid State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*, Springer-Verlag, Berlin 2006.

Morrison RT, Boyd RN: *Organska kemija,* Sveučilišna naklada Liber, Zagreb, 1979.

Nollet ML, Toldrá L: *Food Analysisby HPLC Third Edition*. CRC Press Taylor & Francis Group, 2013.

Panda BP, Bhargav S, Ali M, Javed S: *Solid-state fermentation: An overview*. Chemical and biochemical engineering quarterly, 22(1): 49-70, 2008.

Pandy A, Soccol CR, Larroche C: *Curent Developments in Solid-state Fermentation*. Asiatech Publishers Inc., New Delhi, 2008.

Perić P: *Sok od grožđa,* Veleučilište u Požegi, Požega, 2013.

Planinić M., Bucić A., Tomas S., Bilić M., Velić D., Koceva Komlenić D.: Fast moisture determination methods in flour samples. *Proceedings of International Congress FLOUR-BREAD '03 AND 4. Croatian Congress of Cereal.* Faculty od Food Technology, Osijek, 2004.

RaghavaRao KSMS, Gowthaman MK, Ghildyal NP, Karanth NG: A mathematical model for solid state fermentation in tray bioreactors. *Bioprocess Engineering* 8:255-262, 1993.

Ribereau-Gayon J, Peynaud E, Ribereau-Gayon P, Sudraud P: *Scienceset Techniques du Vin*, Vol. 3*: Vinifications – Transformations duvin*, Dunod, Paris.,1976.

Šibalić D: *Utjecaj uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost šećera iz kukuruzne silaže*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.

Thalaro K, Thalaro A: *Foundations in microbiology*, Wm-C. Brown Publisher, USA, 1996.

Tišma M: *Proizvodnja laktoze submerznim uzgojem Trametes versicolor*. Doktorski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2010.

Tomas S, Planinić M, Bucić-Kojić A: *Jedinične operacije u prehrambenom i procesnom inženjerstvu*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.

Veljković V B, Milenović D M : *Analiza ekstrakcije rezionida kantariona (Hypericum perforatum L.)*. Kemija u industriji 56:60-67, 2002.

Voća N: *Proizvodnja toplinske energije iz vinske komine,* Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, 2010.

Ward G, Hadar Y, Dosoretz CG: *The biodegradation of lignocellulose by white rot fungi,* U Fungal biotechnology in agricultural, food and enviromantal applications, Marcel Dekker Inc., 2004.

Webster J., Weber R.: *Introduction to fungi*, Cambridge University Press, Cambridge 2007.

Xavier AMRB., Tavares APM., Ferreira R, Amado F: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by products of pulp and paper industry, *Electronic Journal of Biotechnology*: 10, 444–451, 2007.

Young RA, Masood A: *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*, Wiley, John &Sons, Inc., New York,1998.