

Utjecaj biološke obrade kukuruzne silaže pomoću *Trametes versicolor* na ekstrakciju fenolnih spojeva

Kajić, Dragana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:109:209442>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Dragana Kajić

UTJECAJ BIOLOŠKE OBRADJE KUKURUZNE SILAŽE POMOĆU
***TRAMETES VERSICOLOR* NA EKSTRAKCIJU FENOLNIH SPOJEVA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2015.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za procesno inženjerstvo

Katedra za tehnološke operacije

Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Jedinичne operacije u procesnom inženjerstvu

Tema rada je prihvaćena na VIII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 26.5.2015.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić

Utjecaj biološke obrade kukuruzne silaže pomoću *Trametes versicolor* na ekstrakciju fenolnih spojeva

Dragana Kajić, 254 – DI

Sažetak: U ovome radu ispitan je utjecaj procesnih uvjeta (broj plagova - P , masa kukuruzne silaže - m , pH i vrijeme fermentacije) biološke obrade kukuruzne silaže na ekstrakciju fenolnih spojeva (ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i fenolnih kiselina: p -kumarinske, ferulične i kafeinske) metodom odzivnih površina prema Box-Behnkenovom planu pokusa. Biološka obrada uzoraka provedena je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor*. Biološki obrađeni uzorci osušeni su pri 45 °C tijekom 48 h, te su nakon toga podvrgnuti ekstrakciji (uvjeti ekstrakcije: 50% otopina etanola/80 °C/120 min/200 rpm).

U ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže spektrofotometrijskim metodama analizirani su ukupni fenolni spojevi (Folin-Ciocalteuovom metodom - 9,47 mg_{GAE}/g_{s.t.} i Prussian-Blue metodom - 0,55 mg_{GAE}/g_{s.t.}) i ukupni flavonoidi (1,47 mg_{CE}/g_{s.t.}) te su HPLC metodom određene individualne fenolne kiseline (p -kumarinska: 0,36 mg/g_{s.t.}, ferulična: 0,27 mg/g_{s.t.} i kafeinska: 0,14 mg/g_{s.t.}). Broj plagova gljive *T. versicolor* i masa kukuruzne silaže tijekom procesa biološke obrade imali su najveći utjecaj na prinos fenolnih tvari.

Za opisivanje procesa biološke obrade kukuruzne silaže korišten je kvadratni polinom koji je dobro opisivao ispitivani proces s ciljem dobivanja maksimalnog prinosa analiziranih fenolnih tvari. Ipak, najbolja slaganja modelom predviđenih podataka i eksperimentalnih rezultata uočena su kod kafeinske kiseline. Metodom odzivnih površina određeni su optimalni uvjeti biološke obrade kukuruzne silaže s ciljem dobivanja maksimalnog prinosa ispitivanih spojeva. Kod kafeinske kiseline optimalni uvjeti su: 9 plagova, 40 g kukuruzne silaže, pH 9 i 10 dana fermentacije. Pri tim uvjetima predviđeni maksimalni prinos kafeinske kiseline koji bi se mogao ekstrahirati je 0,14 mg/g_{s.t.} što je u skladu s eksperimentalno određenim maksimalnim prinosom kafeinske kiseline.

Ključne riječi: kukuruzna silaža, fenolni spojevi, metoda odzivnih površina

Rad sadrži: 66 stranica
26 slika
18 tablica
46 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

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

Datum obrane: 17. srpnja 2015.

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 Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process engineering
Subdepartment of Unit operations
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Unit operations in Process engineering

Thesis subject: was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. VIII held on July 17th 2015.

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

Influence of biological pretreatment of corn silage with *Trametes versicolor* on phenolic compounds extraction

Dragana Kajić, 254-DI

Summary: The influence of process conditions (number of plugs - P , mass of corn silage - m , pH and duration of fermentation) in biological treatment of corn silage on extractability of phenolic compounds (total phenols, total flavonoids and phenolic acids: p -coumaric acid, ferulic acid and caffeic acid) was investigated using response surface methodology (Box-Behnken design).

Biological treatment was performed in condition of solid-state fermentation with white-rot fungi *Trametes versicolor*. Extraction of phenolic compounds from dried (at 45 °C/ 48h by oven) biologically treated samples was performed using 50% aqueous ethanol solution, 80°C during 120 min.

Total phenolic compounds (FC method – 9.47 mg_{GAE}/g_{db} and PB method – 0.55 mg_{GAE}/g_{db}) and total flavonoids (1.47 mg_{CE}/g_{db}) from biological treated samples were determined by spectrophotometric methods, while individual phenolic acids (p -coumaric: 0.36 mg/g_{db}, ferulic acid: 0.27 mg/g_{db} i caffeic acid: 0.14 mg/g_{db}) were analyzed by HPLC device. Number of *Trametes versicolor* plugs and mass of corn silage had the highest impact on extraction yield of phenolic compounds.

Quadratic polynomial was used to describe biological treatment of corn silage in order to maximize phenolic compounds yield. However, the best matching of predicted data and experimental results was noticed with caffeic acid.

Response surface methodology was used for determination of optimal conditions for biological treatment of corn silage in order to maximize the analyzed compounds yield. Optimal conditions for maximum caffeic acid yield were: 9 plugs, 40g of corn silage, pH 9 and 10 days of fermentation. However, in these conditions maximum caffeic acid yield that could be extracted is 0.14 mg/g_{db}, which is in accordance with maximum experimental caffeic acid yield.

Key words: corn silage, phenolic compounds, response surface methodology

Thesis contains: Pages: 66
Figures: 26
Tables: 18
References: 46

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: July 17, 2015.

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

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici profesorici Ani-Bucić Kojić na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem prijateljici Aniti Kolaković, koja mi je uvelike olakšala vrijeme provedeno u laboratoriju i s kojom sam to sve podijelila.

I na kraju najveću zahvala ide mojim roditeljima i sestri, bez kojih sve ovo što sam do sada postigla ne bi bilo moguće!

Veliko hvala svima!

Ovaj rad izrađen je u sklopu "ProBioTech" projekta koji je sufinancirala Europska unija iz Europskog Fonda za regionalni razvoj (EFRR).



Ulaganje u budućnost!
Europska unija

Sadržaj

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO	3
2.1.	KUKURUZNA SILAŽA	4
2.1.1.	Kemijski sastav kukuruzne silaže.....	5
2.2.	GLJIVE BIJELOG TRULJENJA.....	6
2.2.1.	Gljiva <i>Trametes versicolor</i>	7
2.3.	FENOLNI SPOJEVI.....	7
2.3.1.	Fenolne kiseline.....	8
2.3.2.	Flavonoidi	10
2.4.	EKSTRAKCIJA	10
2.4.1.	Ekstrakcija kruto – tekuće	11
2.4.2.	Faktori koji utječu na ekstrakciju kruto – tekuće	12
2.4.3.	Fermentacija na čvrstim nosačima.....	12
2.5.	METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH TVARI	13
2.5.1.	Spektrofotometrijske metode.....	13
2.5.2.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	14
2.6.	OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA	14
2.6.1.	Box-Bhenken design	16
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1.	ZADATAK.....	19
3.2.	MATERIJALI I METODE	19
3.2.1.	Materijali	19
3.2.2.	Određivanje suhe tvari	19
3.2.3.	Priprema kalij fosfatnog pufera.....	20
3.2.4.	Biološka obrada kukuruzne silaže pomoću <i>T. versicolor</i>	21
3.2.5.	Kruto – tekuća ekstrakcija fenolnih tvari iz biološki obrađenih uzoraka kukuruzne silaže	22
3.2.6.	Priprema ekstrakta za analizu	23
3.2.7.	Određivanje ukupnih fenolnih spojeva	23
3.2.7.1.	Folin-Ciocalteova metoda	24

3.2.7.2.	Prussian-Blue metoda.....	25
3.2.8.	Određivanje flavonoida.....	26
3.2.9.	Određivanje koncentracije pojedinačnih fenolnih kiselina	27
3.2.10.	Plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina.....	28
4.	REZULTATI	32
4.1.	ODREĐIVANJE SUHE TVARI.....	33
4.2.	KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA FOLIN– CIOCALTEUOVOM METODOM	34
4.3.	KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA PRUSSIAN-BLUE METODOM	35
4.4.	KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA	36
4.5.	REGRESIJSKE JEDNADŽBE ZA IZRAČUNAVANJE MASENE KONCENTRACIJE POJEDINAČNIH FENOLNIH KISELINA	37
4.6.	IZRAČUNAVANJE MASENOG UDJELA FENOLNIH SPOJEVA	38
4.7.	UTJECAJ PROCESNIH UVJETA BIOLOŠKE OBRADE NA EKSTRAKTIBILNOST UKUPNIH FENOLNIH TVARI, FLAVONOIDA I FENOLNIH KISELINA IZ BIOLOŠKI OBRADENE KUKURUZNE SILAŽE TE ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA BIOLOŠKE OBRADE METODOM ODZIVNIH POVRŠINA ...	38
4.7.1.	Modeliranje procesa biološke obrade kukuruzne silaže pomoću <i>Trametes versicolor</i>	41
4.7.2.	Optimiranje procesa biološke obrade kukuruzne silaže pomoću <i>T. versicolor</i>	54
5.	RASPRAVA	55
6.	ZAKLJUČCI.....	60
7.	LITERATURA.....	62

Popis oznaka, kartica i simbola

Oznake:

A – apsorbancija

c – masena koncentracija fenolnih tvari [$\text{mg}_{\text{GAE(CE)}}$ /mL]

c_{CE} – masena koncentracija otopine (+)- katehina [mg/mL]

c_{GAE} – masena koncentracija otopine galne kiseline [mg/mL]

C_{UFL} – maseni udio ukupnih flavnoida [mg_{CE} / $\text{g}_{\text{s.t.}}$]

C_{UFT} – maseni udio ukupnih fenolnih spojeva [mg_{GAE} / $\text{g}_{\text{s.t.}}$]

m – masa [g]

I_0 – intenzitet ulazne svjetlosti

I_p – intenzitet propuštene svjetlosti

l – duljina optičkog puta [m]

M – molekularna masa

R – koeficijent korelacije

$Y_{\text{UFT_FC}}$ – prinos ukupnih fenola određenih FC metodom

$Y_{\text{UFT_PB}}$ – prinos ukupnih fenola određenih PB metodom

Y_{UFL} – prinos ukupnih flavonoida

$Y_{\text{p-CuA}}$ – prinos *p*-kumarinske kiseline

Y_{CA} – prinos kafeinske kiseline

Y_{FA} – prinos ferulične kiseline

λ – valna duljina

t – vrijeme fermentacije [dani]

$w_{\text{s.t.}}$ – udio suhe tvari

Kratice:

CE – ekvivalent (+)- katehina

EtOH – etanol

df – stupnjevi slobode

FA – ferulična kiselina

F vrijednost – faktor koji pokazuje koliko je jedna varijanca veća od druge

FC – Folin Ciocalteu

GAE – ekvivalenti galne kiseline

Lac – lakaza

LiP – lignin peroksidaza

MnP – mangan peroksidaza

MS-varijanca – prosječno odstupanje varijanata od prosječne vrijednosti uzorka

s.t. – suha tvar

SS – suma kvadrata odstupanja svih varijanata od prosječne vrijednosti

SSF – fermentacija na čvrstim nosačima

UFT - ukupne fenolne tvari

UFL – ukupni flavonoidi

PB – Prussian Blue

*p*CuA – kumarinska kiselina

CA – kafeinska kiselina

P – broj plagova

P_p – površina pika

Simboli:

ϵ – koeficijent molarne ekstinkcije (apsorbancije), [m³/mol·m]

1. UVOD

Kukuruzna silaža je glavno biljno krmivo za ishranu stoke u Europi i Hrvatskoj, koje nastaje procesom anaerobne fermentacije cjelovite biljke kukuruza (*Zea Mays L.*). Predstavlja visokoenergetsku sirovinu sa visokom koncentracijom neto energije u obliku škroba (Vranić i sur. 2004; Weinberg i sur., 2011). Pored dobrih nutritivnih svojstava koji kukuruznu silažu čine idealnom za ishranu stoke, u zadnje vrijeme se sve više koristi kao supstrat, zajedno sa stajskom gnojnicom, za proizvodnju bioplina u procesu anaerobne kodigestije (Kuzmanović i sur., 2015).

Budući da je kukuruzna silaža lignocelulozni materijal, u svome sastavu sadrži polimere celuloze, hemiceluloze i lignina. Tijekom razgradnje lignina, djelovanjem različitih mikroorganizama, nastaju neki od fenolnih spojeva čija prisutnost može djelovati inhibitorno tijekom postupka proizvodnje bioplina. Međutim, mogu nastati i fenolni spojevi, kao sekundarni metaboliti, koji imaju dobra antioksidacijska, antimikrobna, protuupalna i antikancerogena svojstva (Kuzmanović i sur., 2015). Fenolne kiseline i flavonoidi su samo neki od fenolnih spojeva koji nastaju tijekom razgradnje lignina.

Gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* sposobna je razgraditi lignocelulozne supstrate u molekule manje molekularne mase tako što luči ekstracelularno smjesu lignolitičkih enzima (LiP, MnP i lakazu) (Gadd, 2001).

Poljoprivredni ostaci i ostaci iz prehrambene industrije su dobri i jeftini supstrati za fermentaciju na čvrstim nosačima jer su bogati ugljikohidratima (izvor ugljika) za mikroorganizme, kao što je kukuruzna silaža. U usporedbi sa submerznim načinom fermentacije, SSF daje veće prinose i produktivnost, te manji troškovi ulaganja (jeftiniji supstrat) (Rodríguez Couto i Ángeles Sanromán, 2006; Mussato i sur., 2012).

S obzirom na navedeno, cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj biološke obrade kukuruzne silaže pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* na ekstrakciju fenolnih spojeva (ukupni fenolni spojevi, ukupni flavonoidi i fenolne kiseline) te odrediti optimalne uvjete procesa biološke obrade kukuruzne silaže gljivom *T. versicolor*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KUKURUZNA SILAŽA

Procesom anaerobne fermentacije cjelovite biljke kukuruza (*Zea Mays L.*) nastaje kukuruzna silaža, pri čemu djelovanjem mliječno-kiselih bakterija dolazi do nastanka mliječne i octene kiseline kao posljedice konverzije topljivih ugljikohidrata (Weinberg i sur., 2011). Pored dobrih nutritivnih svojstava u ishrani stoke, u zadnje vrijeme se koristi kao supstrat, zajedno sa stajskom gnojnicom, za proizvodnju bioplina u procesu anaerobne kodigestije (Kuzmanović i sur., 2015).

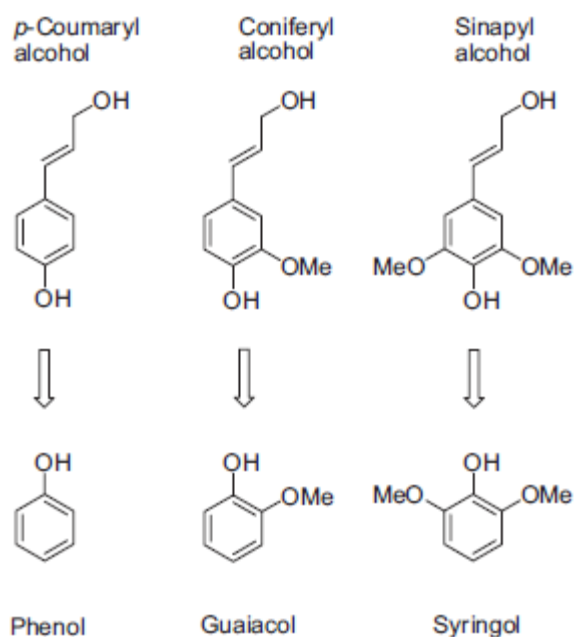
Visoki udio ugljikohidrata čini kukuruznu silažu visokoenergetskom sirovinom (31,2% celuloze, 23,9% hemiceluloze i 20,1% lignina). Tijekom razgradnje lignina, djelovanjem različitih mikroorganizama, nastaju neki od polifenolnih spojeva čija prisutnost može djelovati inhibitorno tijekom postupka proizvodnje bioplina. Međutim, mogu nastati i fenolni spojevi koji imaju dobra antioksidacijska, antimikrobna, protuupalna i antikancerogena svojstva (Kuzmanović i sur., 2015).



Slika 1 Kukuruzna silaža (Corn Agronomy, 2015)

2.1.1. Kemijski sastav kukuruzne silaže

Kukuruzna silaža je lignocelulozni materijal koji sadrži polimere celuloze, hemiceluloze i lignina. U svom sastavu lignin sadrži različito povezane fenilpropanoidne jedinice (*p*-kumarilni alkohol, koniferilni i sinapilni alkohol) čijom razgradnjom nastaju fenolni spojevi (**Slika 2**) (Kleinert i Barth, 2008; Schroyen i sur., 2015).



Slika 2 Monomeri koji izgrađuju lignin i njihovi produkti razgradnje (Kleinert i Barth, 2008)

Udio hranjivih tvari i energetska vrijednost kukuruzne silaže je biološki određena omjerom stabljike, lista i klipa (zrna) u suhoj tvari hibrida, klimatskim uvjetima u godini proizvodnje, visinom gnojidbe, stupnjem zrelosti i mehaničke prerade u trenutku žetve, odnosno udjelom škroba i vlakana. Faktor koji najviše utječe na probavljivost, energetska vrijednost i podobnost cijele biljke kukuruza za siliranje je stadij zrelosti u trenutku žetve (Vranić i sur., 2004).

Tijekom sazrijevanja biljke dolazi do porasta koncentracije suhe tvari (s.t.) radi nakupljanja škroba u zrnu, pri čemu opada udio šećera topljivih u vodi, frakcija vlakana i probavljivost stabljike (Vranić i sur., 2004).

Tablica 1 Prosječan kemijski sastav kukuruzne silaže (Vranić i sur., 2004)

Parametar	Prosjek
Korigirana suha tvar (s.t.) g/kg	391,78
Sirovi proteini g/kg _{s.t.}	65,19
Probavljivost organske tvari %	71,6
Neutralna detergent vlakna g/kg _{s.t.}	425,33
Kisela detergent vlakna g/kg _{s.t.}	262,56
Škrob g/kg _{s.t.}	335,13
Metabolička energija MJ/kg _{s.t.}	11,45
pH	3,7
Organska tvar g/kg _{s.t.}	949,21
Fermentirajuća metabolička energija	0,81

Fenolne kiseline, osobito ferulična i *p*-kumarinska kiselina zauzimaju veliki dio stanične stijenke kukuruzne silaže. Eterskim i esterskim vezama su povezani unutar lignina i sa ugljikohidratima u staničnoj stijeci, te daju stijenci čvrstoću i otpornost na mikrobiološku razgradnju. Ranija istraživanja su pokazala da se većina slobodne ferulične kiseline razlaže na vanilin, vanilinsku kiselinu i protokatehinsku kiselinu, dok se slobodna *p*-kumarinska kiselina razlaže na *p*-hidroksibenzaldehid, *p*-hidroksibenzojevu kiselinu i protokatehinsku kiselinu. Cao i sur. (2014) su dokazali da je udio ukupne ferulične kiseline u kukuruznoj silaži iznosio $5,3 \pm 0,21$ g/kg_{s.t.}, dok je udio ukupne *p*-kumarinske kiseline iznosio $16,1 \pm 0,13$ g/kg_{s.t.}.

2.2. GLJIVE BIJELOG TRULJENJA

Gljive bijelog truljenja su jedini do sada poznati organizmi koji razgrađuju lignin iz drveta i mogu se podijeliti u tri grupe:

- Gljive bijelog truljenja
- Gljive smeđeg truljenja
- Gljive blagog truljenja.

Gljive bijelog truljenja uključuju razrede *Basidiomycota* i *Ascomycota* i sposobne su razgraditi lignocelulozne supstrate u molekule manje molekularne mase tako što luče ekstracelularno smjesu lignolitičkih enzima. Pošto lignin iz lignoceluloznog materijala ne mogu iskoristiti kao izvor ugljika za rast i razvoj, ove gljive ga svojim izvanstaničnim enzimima razgrađuju i dolaze do celuloze koju koriste kao drugi izvor ugljika (Gadd, 2001). Gljive bijelog truljenja su vrlo su pogodne za bioremedijacijske

procesu budući da im njihovi izvanstanični enzimi omogućuju podnošenje nepovoljnih i toksičnih uvjeta kao i visoke temperature i široki raspon pH vrijednosti (Altman, 1998).

Tri su glavna enzima koje luče gljive bijelog truljenja: lakaza (Lac), lignin peroksidaza (LiP) i mangan peroksidaza (MnP). Kombinacija tih izvanstaničnih lignolitičkih enzima odgovorna je za razgradnju lignina. S obzirom na ustrojstvo i proizvodnju lignolitičkih enzima gljive bijelog truljenja mogu se podijeliti na (Altman, 1998):

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

2.2.1. Gljiva *Trametes versicolor*

Trametes versicolor ili šarena tvrdokoška gljiva je bijelog truljenja razreda *Basidiomycota* koja raste u nakupinama ili preklapajućim formacijama na deblima, stabljikama i otpalim granama raspadajućeg i mrtvog, a ponekad i na ranama živog drveća. Široko je rasprostranjena u prirodi te uzrokuje delignifikaciju drveta. Pomoću tri lignolitička enzima koja luči (LiP, MnP i lakazu) uspješno razgrađuje lignin, policikličke aromatske ugljikovodeike, mješavine različitih polikloriranih bifenila i brojne sintetičke boje. Moguće je regulirati metabolizam dodatkom različitih induktora u cilju povećanja proizvodnje lignolitičkih enzima, a neki od induktora su: bakar, veratilni alkohol, te različite smjese fenolnih spojeva (Xavier i sur., 2007).

Najveću primjenu *Trametes versicolor* ima u industriji pulpe i papira. Gljiva uspješno obavlja delignifikaciju, izbjeljivanje i omekšavanje pulpe, te obezbojava izlazne tokove nastale izbjeljivanjem pulpe. Na taj način izbjegnuta je upotreba jakih organskih ili anorganskih kiselina te drugih kemikalija nepogodnih za okoliš (Young i Masood, 1998). Koristi se u procesima bioremedijacije jer razgrađuje ili akumulira neke od današnjih najgorih onečišćivača okoliša poput antracena, dioksina, trinitrotoluena (TNT) (Thalero i Thalero, 1996; Webster i Weber, 2007).

2.3. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti i čine jednu od najbrojnijih skupina spojeva u prirodi. Prisutni su u velikom broju biljnih vrsta gdje nastaju tijekom njihovog normalnog razvoja ili kao odgovor na stres (oštećenja, UV zračenje, infekcije) (Naczki i Shahidi, 2006). Međusobno se

razlikuju po strukturi i u prirodi predstavljaju najbrojniju skupinu spojeva a zasad ih je poznato oko 8000 (Bravo, 1998).

Osnovnu strukturu fenolnih spojeva čini aromatski prsten na koji može biti vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Bravo, 1998.). Ovisno o broju aromatskih prstena unutar strukture fenola, razlikujemo monofenole koji sadrže jedan benzenski prsten na koji je vezana jedna ili više OH skupina (jednostavni fenoli, fenolne kiseline i njihovi derivati) i fenolne spojeve koji sadrže veći broj benzenskih prstenova u svojoj strukturi (flavonoidi) (Macheix i sur., 1990; Naczki i Shahidi, 2004; Maestri i sur., 2006; Pereira i sur., 2009; Katalinić i sur., 2010).

Fenolnim spojevima se pripisuje višestruko pozitivno djelovanje. Osim zaštitne uloge u obrani organizma od različitih bolesti očituju se u antioksidativnom, antibakterijskom, protuupalnom, antialergijskom, antimutagenom, antiviralnom i antikancerogenom djelovanju (Chafer i sur., 2002).

Antioksidativno djelovanje se očituje kroz vezanje slobodnih radikala. Slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci, zbog čega su vrlo reaktivni pa mogu prouzročiti oksidaciju okolnih biomolekula (proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinskih kiselina). Nagomilavanje i masovno djelovanje slobodnih radikala u organizmu naziva se „oksidacijski stres“ te narušava zdravlje i povezuje se s nastankom brojnih bolesti, među kojima je i kancerogeno oboljenje. Što je veći „oksidacijski stres“ u organizmu, veća su oštećenja i oboljenja. Antioksidativno djelovanje fenolnih spojeva se očituje kroz sprječavanje nastanka oksidacijskog stresa tako što štite stanicu od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala (Cos i sur., 1998.; Parr i sur., 2002.). Pored antioksidativnog djelovanja, u biljkama djeluju antimikrobno i štite od UV zračenja. Utječu na boju, okus i miris hrane te joj daju stabilnost. Dodatkom antioksidansa u masti sprječava se njihova autooksidacija i povećava se trajnost namirnica (Bucić-Kojić, 2008.).

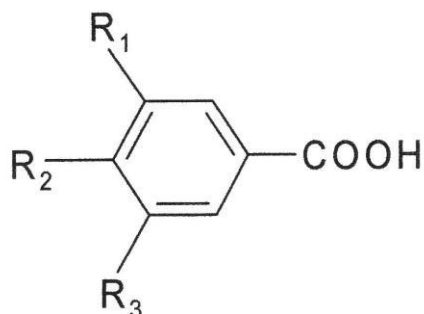
U fenolne spojeve pripadaju: fenolne kiseline, kumarini, flavonoidi, tanini, stilbeni, lignini i lignani (Naczki i Shahidi, 2006).

2.3.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline mogu biti prisutne u slobodnom ili vezanom obliku i čine oko trećinu fenolnih spojeva prisutnih u biljkama. Mogu se podijeliti u dvije skupine, ovisno o stupnju hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena, a to su hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline te njihovi derivati (Macheix i sur., 1990; Bravo, 1998).

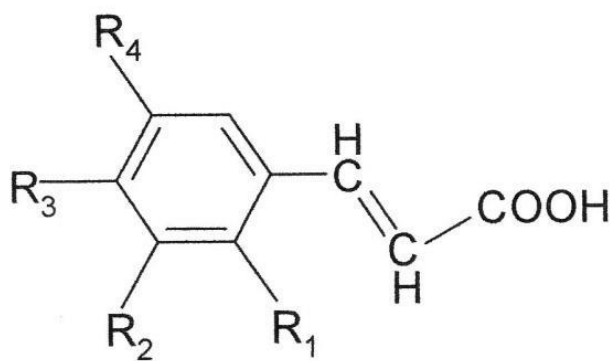
Hidroksibenzojeve kiseline su derivati benzojeve kiseline, iz koje nastaju direktno i prisutne su obično u slobodnom obliku ali mogu biti i u obliku konjugiranih šećera, estera i organskih kiselina

(Schuster i Hermann, 1985; Macheix i sur., 1990; Strack, 1997). U skupinu hidroksibenzojevih kiselina pripadaju: galna, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringična, protokatehinska, salicilna i gentizinska kiselina (Macheix i sur., 1990; Pereira i sur., 2009).



Slika 3 Osnovna struktura hidroksibenzojeve kiseline (Dent, 2013)

Hidroksicimetne kiseline su derivati fenilpropanoida (Apak i sur., 2007). Rijetko se u prirodi nalaze u slobodnom obliku i u tu skupinu kiselina pripadaju: *p*-kumarinska, kafeinska, ferulična i sinapinska kiselina (Han i sur., 2007; Pereira i sur., 2009; Dai i sur., 2010).



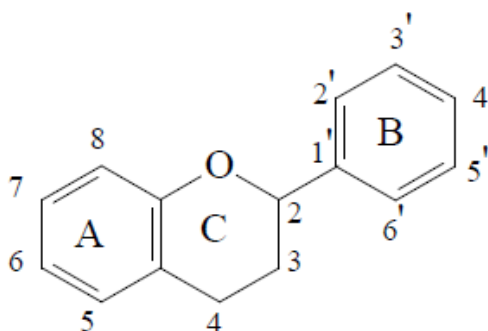
Slika 4 Osnovna struktura hidroksicimetne kiseline (Dent, 2013)

2.3.2. Flavonoidi

Flavonoidi su dobili ime prema latinskoj riječi flavus (žuta) iako su poznati kao crveni, plavi i ljubičasti pigmenti (antocijani) u biljnom tkivu (Winkel-Shirley, 2001). Pripadaju najbrojnijoj skupini fenolnih spojeva koju nalazimo u različitim biljnim vrstama, te ih je identificirano više od 6400 (Kazazić, 2004).

Flavonoidi su fenolni spojevi sastavljeni od 15 atoma ugljika sa dva aromatska prstena (A i B) međusobno povezana trećim (C) koji sadrži kisik (**Slika 5**). Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan (C6-C3-C6) odnosno 1-fenil-3-(2-hidroksifenil)propan-1-ol iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem C-prstena rezultira flavan, na osnovi kojeg se formira određeni broj osnovnih struktura.

Flavonoidi prisutni u biljkama međusobno se razlikuju po položaju hidroksilnih i glikozidnih skupina te po konjugaciji između prstena A i B. U biljnom materijalu se najčešće nalaze u obliku 3-O-glikozida ili polimera (tanina). Šećer koji se uglavnom veže je glukoza, no javljaju se i galaktoza, ramnoza i ksiloza (Kazazić, 2004).



Slika 5 Osnovna monomerna struktura flavonoida (Bucić–Kojić, 2008)

2.4. EKSTRAKCIJA

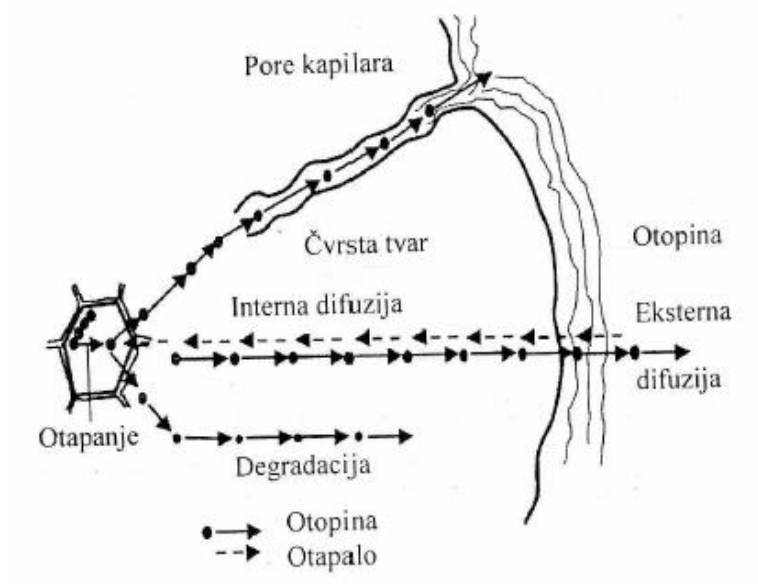
Ekstrakcija je jedinična operacija koja potpuno ili djelomično odjeljuje smjese tvari koje imaju različitu topljivost u različitim otapalima. Smjesa koja se odjeljuje obrađuje se otapalom u kojem se otapa komponenta koja se želi izdvojiti, tj. selektivnim otapalom. Ovisno o polaznoj fazi iz koje se tvar ekstrahira, proces ekstrakcije se dijeli na:

1. Ekstrakciju kruto-tekuće (ekstrakcija otapalom) – prijenos tvari se odvija iz krute faze, a ukoliko se provodi otapalom koje nije lako hlapljivo često se naziva i izluživanje

2. Ekstrakcija tekuće-tekuće – prijenos tvari se odvija iz tekuće faze. Ovaj tip ekstrakcije se obično naziva ekstrakcija u užem smislu (Floros i sur., 1999).

2.4.1. Ekstrakcija kruto – tekuće

Kruto-tekuća ekstrakcija je najčešće korištena operacija izolacije aktivnih supstanci iz biljnog materijala. Predstavlja operaciju kojom se iz čvrstog permeabilnog materijala, sastavljenog iz više sastojaka, izdvaja jedna ili više komponenti uz pomoć odgovarajućeg otapala u nekoliko osnovnih koraka (**Slika 6**): ulazak otapala u krutu tvar, otapanje komponenti, transport otapala s otopljenom tvari na površinu krute tvari, transport otopine s površine krute tvari u glavnu masu otopine, razdvajanje ekstrakta i krutog ostatka uzorka (Bucić-Kojić, 2008).



Slika 6 Shema glavnih koraka ekstrakcije tvari iz krute tvari otapalom (Bucić-Kojić, 2008)

Prijenos mase u procesu ekstrakcije otapalom

Zbog razlike koncentracija između dvije faze koje su u kontaktu, dolazi do prijenosa mase koji se odvija u smjeru uspostavljanja ravnoteže. Uslijed kontakta nekog tijela ili čestice s tekućinom koja ga otapa, pretpostavlja se da se na njegovoj površini vrlo brzo stvara sloj zasićene otopine (faza ispiranja ili brza ekstrakcija). Taj sloj je potrebno ukloniti kako ne bi došlo do prestanka otapanja, a time i ekstrakcije. Uklanjanje topljivog materijala iz graničnog sloja u glavnu masu otopine odvija se redovito kombinacijom molekularne i konvekcijske difuzije (Chalermchat i sur., 2004).

2.4.2. Faktori koji utječu na ekstrakciju kruto – tekuće

Postoji niz različitih faktora o kojima ovisi proces ekstrakcije (topljivost komponente u otapalu, temperatura ekstrakcije, površina materijala koja je izložena otapalu, viskoznost otapala, volumni protok otapala i dr.) i koji utječu na brzinu odvijanja ekstrakcije.

Pošto je brzina prijenosa mase direktno proporcionalna površini materijala, prije ekstrakcije potrebno je materijal usitniti do određenog stupnja i homogenizirati. Izbor otapala za ekstrakciju ovisi o vrsti i svojstvima komponente koja se treba ekstrahirati. Iz tih razloga, potrebno je uzeti u obzir: polarnost, točku ključanja (treba biti što niža kako bi bilo olakšano izvajanje otapala od komponente), reaktivnost (otapalo ne smije reagirati sa ekstraktom, niti se smije razgrađivati), viskoznost (otapalo treba imati nizak viskozitet), stabilnost otapala na toplinu, kisik i svjetlo, sigurnost pri upotrebi (nezapaljivo, neškodljivo za radnike i potrošače s kojima dolazi u dodir, neškodljivo za okoliš) i cijenu (po mogućnosti što jeftinije i pogodno za ponovnu upotrebu) (Drmić i Jambrak, 2010).

Provođenje ekstrakcije pri višim temperaturama je pogodnije jer dolazi do ubrzavanja procesa zbog povećanja brzine otapanja komponente koja se izvaja, kao i brzine difuzije komponente u volumen otapala. Unatoč tome, temperature rijetko prelaze 100 °C jer tada može doći do oštećenja željene supstance ili ekstrakcije nepoželjnih tvari. Otapalo mora imati dovoljno nisku viskoznost kako bi moglo proći kroz sloj krutih čestica, a također, veći protok otapala smanjuje granični sloj između koncentrirane otopine i površine čestica, te time povećava brzinu ekstrakcije (Drmić i Jambrak, 2010).

2.4.3. Fermentacija na čvrstim nosačima

Proces fermentacije u kojem mikroorganizmi rastu na čvrstom netopljivom supstratu bez prisutnosti slobodne vode naziva se fermentacija na čvrstim nosačima (SSF). Čvrsti nosač u isto vrijeme je fizička potpora i izvor hranjivih tvari za mikroorganizme. S obzirom na mali udio vode u supstratu ovaj način uzgoja mikroorganizama pogoduje rastu gljiva koje je moguće pronaći u prirodi na drveću, sjemenkama, korijenju i sl. (Rodríguez Couto i Ángeles Sanromán, 2006).

Upotreba čvrstih supstrata predstavlja jedan od najstarijih načina iskorištavanja mikroorganizama. Veliku primjenu ima u proizvodnji hrane, pića, raznih kemikalija (etanol), hidrolitičkih enzima, organskih kiselina, aroma, bojila, a u zadnje vrijeme SSF se koristi u razvoju različitih bioprocasa kao što je obrada čvrstog otpada, proizvodnja sekundarnih metabolita i proizvodnja funkcionalne hrane. U industrijskom mjerilu ovaj proces može se kontrolirano koristiti za dobivanje željenog proizvoda (Rodríguez Couto i Ángeles Sanromán, 2005; Mussato i sur., 2010).

Poljoprivredni ostaci i ostaci iz prehrambene industrije su dobri i jeftini supstrati za fermentaciju na čvrstim nosačima jer su bogati ugljikohidratima (izvor ugljika) za mikroorganizme. U usporedbi sa submerznim načinom fermentacije, SSF daje veće prinose i produktivnost, manji su troškovi ulaganja (jeftiniji supstrat) (Rodríguez Couto i Ángeles Sanromán, 2005; Mussato i sur., 2012).

2.5. METODE ODREĐIVANJA FENOLNIH TVARI

Za analizu fenolnih spojevanajčešće se koriste različite spektrofotometrijske te kromatografska metoda (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC).

2.5.1. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrijske metode se temelje na Lambert-Beerovom zakonu:

$$\log \left(\frac{I_0}{I_p} \right) = A = \varepsilon \cdot l \cdot c_a \quad (1)$$

gdje je:

I_0 – intenzitet ulazne svjetlosti

I_p – intenzitet propuštene svjetlosti

A – apsorbancija

c_a – množinska koncentracija tvari, [mol/m³]

l – dužina optičkog puta, [m]

ε – koeficijent molarne ekstinkcije (apsorbancije), [m³/mol·m]

Pošto je apsorbancija izravno proporcionalna koncentraciji tvari u otopini, Lambert-Beerov zakon omogućuje određivanje koncentracije obojenih otopina ili onih kod kojih tijekom reakcije nastaje obojenje. Zbog prolaska snopa paralelnih zraka monokromatskog svjeta kroz homogenu tekućinu, plinovitu ili krutu tvar, dolazi do smanjenja intenziteta svjetlosti jer ta tvar apsorbira svjetlosno zračenje. Apsorpcija svjetlosnog zračenja ovisi o nekoliko faktora: prirodi tvari koja apsorbira svjetlost, valnoj duljini upadne svjetlosti, temperaturi, vremenu trajanja reakcije, debljini

sloja tvari, prisutnosti tvari koje interferiraju, a kad je riječ o otopinama, i o njihovoj koncentraciji. Pri ovakvim mjerenjima koristimo standardnu otopinu poznate koncentracije i ispitivanu otopinu, što znači da se ne mjeri apsolutni iznos apsorbancije, nego se uspoređuju intenziteti svjetlosti koja prolazi kroz te dvije otopine. Spektrofotometrijska mjerenja apsorbancije se provode pri valnim duljinama koje odgovaraju određenom apsorpcijskom maksimumu, jer je u toj točki promjena apsorbancije po jedinici koncentracije najveća. Koncentracija ispitivane tvari se određuje s obzirom na baždarnu krivulju koja daje ovisnost apsorbancije o koncentraciji standarda pri istoj valnoj duljini. Standardne otopine moraju po ukupnom sastavu biti što sličnije uzorcima pa baždarne krivulje moraju obuhvatiti sto veće područje koncentracije uzoraka (Bucić-Kojić, 2008).

2.5.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. High-Performance Liquid Chromatography) je oblik kromatografije na stupcu i koristi se u analitičkoj kemiji. Ponekad se u literaturi može pronaći i naziv „Tekućinska kromatografija pod visokim tlakom“ (eng. High pressure liquid chromatography – HPLC). Pod utjecajem visokog tlaka u sustavu, uzorak je nošen pokretnom (mobilnom) fazom preko stacionarne faze u koloni. Komponente uzoraka se različito zadržavaju na koloni što ovisi o specifičnim fizičkim i kemijskim interakcijama. Vrijeme potrebno da tvar dođe do kraja stupca se zove retencijsko vrijeme i karakteristično je za svaku pojedinu tvar, ali ovisi uvelike i o stacionarnoj fazi te sastavu mobilne faze (Skoog i sur., 1999).

Porastom tlaka u sustavu dolazi do povećanja linearne brzine te se poboljšava rezolucija kromatograma zbog kraćeg vremena zadržavanja komponenata.

Razlikuje se normalno-fazna kromatografija (polarna stacionarna i nepolarna mobilna faza) i reverzno-fazna kromatografija (nepolarna stacionarna i polarna mobilna faza).

2.6. OPTIMIRANJE PROCESNIH UVJETA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Optimizacija predstavlja poboljšanje svojstava nekog sustava ili procesa uz postizanje maksimalnog prinosa (odziva) uz što manje troškove, a može se postići empirijskim ili statističkim metodama. Pošto svaki tehnološki proces ovisi o brojnim procesnim parametrima, praćenje i mijenjanje samo jednog parametra uz ostale konstantne parametre neće dati stvarnu sliku utjecaja procesnih parametara na promatrani proces. Takav pristup optimizaciji je češće korišten ranije te zahtjeva veliki utrošak vremena i veliki broj eksperimenata, a ne uzima u obzir interakciju promatranih parametara procesa. Međutim u zadnje vrijeme u optimizaciji procesa se sve više

koriste multivarijantne statističke tehnike koje uzimaju u obzir i interakciju ispitivanih parametara procesa. Jedna od njih je metoda odzivnih površina (eng. Response surface methodology) (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005).

Metoda odzivnih površina obuhvaća skup matematičkih i statističkih metoda utemeljenih na aproksimaciji eksperimentalnih podataka empirijskim modelom (npr. jednadžbom polinoma). Ova metoda se najčešće koristi u slučajevima gdje više varijabli utječe na karakteristike procesa. Prije primjene ove metode potrebno je odabrati odgovarajući dizajn eksperimenata kojim će se definirati eksperimenti koje je potrebno provesti iz ispitivanog eksperimentalnog područja. Provedbom pokusa određenim dizajnom eksperimenata (matrica plana pokusa) dobiva se kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti, a naziva se odzivna ploha. Odzivna funkcija je funkcija koja opisuje odzivnu plohu i prikazuje ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama i njihovim interakcijama. Svakoj funkciji moguće je pridružiti odgovarajući polinom i proračunati koeficijente jednadžbe.

Odabir dizajna eksperimenata ovisi o tome kakvu odzivnu funkciju očekujemo. Dizajn eksperimenata za modele prvog reda (npr. faktorijalni dizajn) koristi se samo u slučajevima kada eksperimentalni podaci ne tvore krivulje odnosno kada se mogu aproksimirati linearnom funkcijom. Kod takvih modela na odzivnu funkciju utječu samo ispitivane nezavisne varijable bez njihove interakcije. Za aproksimaciju eksperimentalnih podataka koji se mogu opisati linearnom funkcijom koristi se eksperimentalni dizajn za kvadratni odziv površine, tj. dizajn za modele drugog reda (kvadratni polinom) kao što su: trofaktorijalni pokus na tri razine, centralni kompozitni dizajn, Box-Bhenken dizajn, itd. Takvi modeli daju funkcionalnu ovisnost zavisne varijable o ispitivanim varijablama te njihovu interakciju, ali i informaciju o maksimumu ili minimumu funkcije (kvadratni član polinoma). Navedeni planovi pokusa međusobno se razlikuju po broju potrebnih pokusa, odabiru eksperimentalnih točaka i razini ispitivanih varijabli (Bezerra i sur., 2008).

Termini u metodi odzivnih površina

- eksperimentalna domena – predstavlja područje ispitivanja odnosno raspon minimalnih i maksimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli (parametara, uvjeta)
- dizajn eksperimenata (plan pokusa) – set eksperimenata određenih matricom koja nastaje različitim kombinacijama ispitivanih varijabli

- faktor ili nezavisne varijable – varijable koje se mogu mijenjati nezavisno jedne od drugih i kontroliraju se tijekom procesa (npr. vrijeme fermentacije, broj plagova mikroorganizma, masa kukuruzne silaže, pH, itd)
- razina varijabli – različite vrijednosti varijabli pri kojima će se eksperiment provesti (npr. varijabla pH vrijednosti na 3 razine: 5, 7 i 9) kako bi se optimizirao neki proces
- odziv ili zavisne varijable – predstavljaju izmjerene vrijednosti eksperimenta (npr. koncentracija)
- ostatak (eng. residual) – predstavlja razliku između izračunatih i eksperimentalno određenih podataka, tj. onaj dio varijabilnosti koji nije moguće objasniti modelom. Dobra aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom ima nisku vrijednost ostatka.

2.6.1. Box-Behnken design

Box-Behnkenov dizajn (**Slika 7**) predlaže kako odabrati točke eksperimenata kada je potrebno ispitati utjecaj više faktora na tri razine uz mogućnost efikasne procjene koeficijenata matematičkih modela prvog i drugog reda.

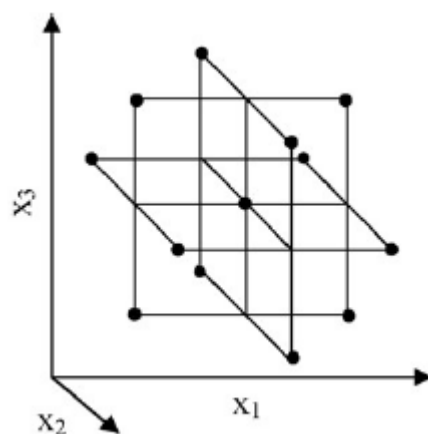
Osnovne karakteristike ovog dizajna su:

- a) zahtjeva broj eksperimenata prema slijedećem izrazu:

$$N = 2^k(k - 1) + c_p \quad (2)$$

gdje je k broj faktora, a c_p broj ponavljanja eksperimenata u centralnoj točki

- b) sve razine faktora moraju se svesti na tri razine (-1, 0, 1) s jednakim intervalom između razina



Slika 7 Primjer Box-Behnkenovog dizajna za tri varijable sa 13 eksperimentalnih točaka

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj biološke obrade kukuruzne silaže pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* na ekstrakciju fenolnih spojeva (ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i fenolnih kiselina). Biološka obrada kukuruzne silaže provedena je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (eng. solid-state fermentation).

Procjena utjecaja četiri ispitivana parametra biološke obrade *T. versicolor* (broj plagova gljive *Trametes versicolor*, masa kukuruzne silaže, pH vrijednost i vrijeme fermentacije) na proces ekstrakcije fenolnih tvari te određivanje optimalnih uvjeta biološke obrade kukuruzne silaže provedeno je metodom odzivnih površina (eng. Response surface methodology) na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih prema Box-Behnkenovom planu pokusa, uz primjenu programa Design Expert 9.0.5.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

Istraživanja su provedena na kukuruznoj silaži sa lokalnog bioplinskog postrojenja (Bovis d.o.o., Ivankovo, Hrvatska) koja je do provedbe eksperimenata čuvana u zamrzivaču na -20 °C. Prije biološke obrade kukuruzna silaža je grubo usitnjena u mlinu (HR 2860, Philips), potom, zajedno sa pripremljenim puferom, sterilizirana u autoklavu (TIP7510945, Sutjeska, Beograd) i ohlađena.

Biološka obrada kukuruzne silaže provedena je pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV-6 (MZKI, Ljubljana, Slovenia) uzgojene na krumpirovom agaru (PDA) (Biolife Italiana Sr.L. Viale Monza, Milan, Italy) pri 27 °C.

3.2.2. Određivanje suhe tvari

Suha tvar u svim uzorcima određena je termogravimetrijskom metodom na uređaju za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo) (**Slika 8**). Ispitivani uzorak stavljen je na aluminijsku pliticu (oko 5 g) koja je postavljena direktno na integriranu vagu u komoru za sušenje, gdje se sušenje provodi do konstantne mase. Odabrani uvjeti sušenja su: brza metoda (eng. *switch-off* 3: gubitak mase od 1 g u 50 s) (Planinić i sur., 2004).

Određivanje suhe tvari provedeno je u dva ponavljanja.



Slika 8 Analizator vlage Mettler Toledo HR 73

3.2.3. Priprema kalij fosfatnog pufera

Pokusi su provedeni pri različitim pH vrijednostima zbog čega je korišten kalij fosfatni pufer pripremljen na slijedeći način:

Napravljen je proračun za masu kalij hidrogen fosfata (K_2HPO_4) kojeg je potrebno otopiti u destiliranoj vodi kako bi se dobila 1M otopina K_2HPO_4 (otopina A): u 500 mL destilirane vode otopljeno je 87,09 g K_2HPO_4 .

Na isti način napravljen je proračun za 1M otopinu kalij dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) (otopina B): u 500 mL destilirane vode otopljeno je 68,045 g KH_2PO_4 .

Otopine A i B pomiješane su u različitim omjerima, ovisno o potrebnoj pH vrijednosti za provedbu pokusa, a željeni pH korigiran je kiselinom ili lužinom (**Tablica 2**).

Tablica 2 Priprema 0,1 M kalij fosfatnog pufera pri 25°C

pH	Volumen 1M K ₂ HPO ₄ (mL)	Volumen 1M KH ₂ PO ₄ (mL)
5,8	8,5	91,5
6	13,2	86,8
6,2	19,2	80,8
6,4	27,8	72,7
6,6	38,1	61,9
6,8	49,7	50,3
7	61,5	38,5
7,2	71,7	28,3
7,4	80,2	19,8
7,6	86,6	13,4
7,8	90,8	9,2
8	94	6

3.2.4. Biološka obrada kukuruzne silaže pomoću *T. versicolor*

Biološka obrada kukuruzne silaže provedena je pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.

Na osnovu plana dobivenih prema Box-Bhenken dizajnu (**Tablica 5**) odvagane su određene mase svježe kukuruzne silaže u laboratorijske staklenke, te je dodan određeni volumen pufera na osnovi preliminarnih istraživanja (umanjen za 10 mL) s ciljem dobivanja vlažnosti materijala 70-90%. 10 ml pufera stavljeno je u staklene epruvete koje su zajedno s priređenim uzorcima u laboratorijskim staklenkama i puferom sterilizirani 20 minuta na 121 °C u autoklavu (TIP7510945, Sutjeska, Beograd) (**Slika 9**), te ostavljeni 24 sata na sobnoj temperaturi radi bolje homogenizacije kukuruzne silaže i pufera te njihovog hlađenja. Prije naciepljivanja određena je vlaga u početnim uzorcima.



Slika 9 Autoklav TIP7510945, Sutjeska, Beograd

U svaku epruvetu s 10 mL kalij fosfatnog pufera raspršen je određeni broj plagova *Trametes versicolor* promjera 5 milimetara prema **Tablici 5**, te su tom suspenzijom micelijskih spora i pufera naciepljeni uzorci.

Tako pripremljeni uzorci su inkubirani tijekom 10, 15 i 20 dana (**Tablica 5**) na 27 °C. Nakon vađenja uzoraka sa inkubacije ponovo je provedena sterilizacija kako bi se zaustavio rast *T. versicolor*. Svaki pokus proveden je u 3 paralelna ponavljanja.

Sterilizirani i ohlađeni uzorci su izvagani, određena im je vlaga na uređaju za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR 73, Mettler Toledo) te su sušeni 48 sati na 45 °C u vakuum sušioniku (Kambič, Slovenia, VS-50 SC).

3.2.5. Kruto – tekuća ekstrakcija fenolnih tvari iz biološki obrađenih uzoraka kukuruzne silaže

Kruto-tekuća ekstrakcija provedena je u vodenoj kupelji sa tresilicom (Julabo SW-23, Njemačka) namijenjena za laboratorijsku upotrebu i ima mogućnost podešavanja temperature (od 25 do 99,99 °C), vremena trešnje (od 1 min do 10h) i frekvencije trešnje (od 20 do 200 rpm) (**Slika 10**).



Slika 10 Vodena kupelj s trešnjom JULABO SW-23

Provedba ekstrakcije

Uzorci koji su nakon provedenog pokusa sušeni 48 sati na 45 °C u vakuum sušioniku (Kambič, Slovenia, VS-50 SC) i smrznuti, prije ekstrakcije su usitnjeni u električnom mlinu (HR 2860, Philips). Odvagan je 1 g usitnjenog uzorka u staklene tikvice te je dodano 40 mL otapala (50% vodena otopina etanola). Staklene tikvice su postavljene u tresilicu koja je prethodno zagrijana na 80 °C, te je provedena ekstrakcija kroz 120 minuta pri 200 rpm.

Ekstrakcija svakog uzorka provedena je u dva ponavljanja (**Slika 10**).

3.2.6. Priprema ekstrakta za analizu

Nakon provedene ekstrakcije suspenzija uzorka i otapala je centrifugirana (Multifuge 3L-R Centrifuge) pri 15000 g u trajanju od 10 minuta. Dekantiranjem je supernatant odvojen od taloga te je korišten za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i pojedinačnih fenolnih kiselina.

3.2.7. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva

Ukupne fenolne tvari su određene spektrofotometrijski Folin-Ciocalteuovom metodom i Prussian Blue metodom.

U obje metode kao standard korištena je galna kiselina. Temeljna otopina galne kiseline pripremljena je u masenoj koncentraciji 5 g/L (otapanjem 0,5 g galne kiseline u 10 mL 96%-tne otopine etanola te nadopunjena destiliranom vodom do oznake u odmjerne tikvici od 100 mL).

3.2.7.1. Folin-Ciocalteova metoda

Folin-Ciocalteuova (FC) metoda je kolorimetrijska metoda utemeljena na oksidacijskim i redukcijskim reakcijama. Folin-Ciocalteuov reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibden kiseline koji u alkalnom mediju oksidira fenolne spojeve, a navedene kiseline reducira u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni, a čija apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 765 nm (Stratil i sur., 2006.).

Postupak izrade kalibracijske krivulje

Od temeljne otopine galne kiseline pripremljena su različita razrjeđenja (0,05 mg/mL – 1,0 mg/mL) tako što je u odmjerne tikvice od 50 mL otpipetirano po 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,5 mL; 5,0 mL; 7,5 mL i 10 mL otopine galne kiseline, te su nadopunjene do oznake destiliranom vodom.

Prema postupku za određivanje ukupnih fenolnih tvari prema metodi Folin-Ciocalteu, određena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine galne kiseline. Iz dobivenih rezultata izrađena je kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline.

Postupak za određivanje ukupnih fenolnih tvari

U epruvetu je otpipetirano 40 µL pripremljenog ekstrakta biološki obrađene kukuruzne silaže, 3160 µL destilirane vode i 200 µL Folin–Ciocalteuova reagensa. Nakon stajanja između 30 sekundi i 8 minuta u epruvetu je dodano 600 µL 20%-tne vodene otopine Na₂CO₃. Na isti način je pripremljena slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta dodan jednaki volumen (40 µL) destilirane vode. Svi uzorci su protreseni na vorteksu (Vibromix 10, Tehnica) i ostavljeni u vodenoj kupelji 30 minuta na 40 °C kako bi se razvila boja čija je apsorbancija mjerena na UV/VIS spektrofotometru (UV-1700 Shimadzu) pri valnoj duljini od 765 nm (**Slika 11**).



Slika 11 UV/VIS spektrofotometar, Shimadzu, UV – 1700 PharmaSpec

Iz očitanih apsorbancija, preko kalibracijske krivulje izračunate su koncentracije ukupnih fenolnih tvari i izražene u ekvivalentima galne kiseline koja je korištena kao standard odnosno u $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ekstrakta. Konačne koncentracije sadržaja ukupnih fenolnih spojeva preračunate su na suhu tvar uzorka ($\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$) radi lakse usporedivosti dobivenih rezultata. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva provedeno je u tri ponavljanja.

3.2.7.2. Prussian-Blue metoda

Prussian-Blue (PB) metoda se temelji na principu da fenolni spojevi reduciraju Fe^{3+} u Fe^{2+} te nastaje kompleks s fericijanidom koji daje plavo obojenje (Budini i sur., 1980.).

Postupak izrade kalibracijske krivulje

Temeljna otopina galne kiseline koncentracije 5 mg/mL razrijeđena je na koncentraciju 1 mg/mL od koje su pripremljena različita razrjeđenja (0,01 mg/mL – 0,07 mg/mL) tako što je u ependorfice otpipetirano po 10 μL ; 20 μL ; 30 μL ; 40 μL ; 50 μL ; 60 μL i 70 μL otopine galne kiseline, te je do 1000 μL nadopunjeno destiliranom vodom.

Prema postupku za određivanje ukupnih fenolnih tvari prema metodi Prussian-Blue, određena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine galne kiseline. Iz dobivenih rezultata izrađena je kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancije o koncentraciji galne kiseline.

Postupak za određivanje ukupnih fenolnih tvari

Prije analize priređeni su potrebni reagensi za provedbu metode. 50 mM otopina željezovog (III) klorida – $\text{Fe}(\text{Cl})_3$ pripremljena je otapanjem 0,811 g $\text{Fe}(\text{Cl})_3$ u 100 mL 0,1 M kloridne kiseline – HCl. Otopina 8 mM kalij-heksacijanoferata - $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ pripremljena je otapanjem 0,263 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ u 100 mL destilirane vode.

Analiza je provedena tako što je u ependorfice otpipetirano 50 μL pripremljenog ekstrakta kukuruzne silaže, 950 μL destilirane vode, 40 μL 50 mM FeCl_3 i 40 μL 8 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Uzorci su pomiješani inverzijom i ostavljeni 20 minuta na sobnoj temperaturi. Na isti način pripremljena je slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta dodan jednaki volumen (50 μL) destilirane vode. Nakon toga mjerena je apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru (UV-1700 Shimadzu) pri valnoj duljini od 720 nm. Iz dobivenih apsorbancija, preko kalibracijske krivulje izračunate su koncentracije ukupnih fenolnih tvari i izražene u ekvivalentima galne kiseline koja je korištena kao standard odnosno u $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$ ekstrakta. Radi lakše usporedivosti dobivenih rezultata, konačne koncentracije sadržaja ukupnih fenolnih spojeva preračunate su na suhu tvar uzorka $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$. Određivanje ukupnih fenolnih tvari provedeno je u tri ponavljanja.

3.2.8. Određivanje flavonoida

Određivanje ukupnih flavonoida provedeno je sprektrofotometrijskom metodom uz pomoć aluminijevog klorida (Marinova i sur., 2005.).

Postupak izrade kalibracijske krivulje za određivanje ukupnih flavonoida

Prije određivanja koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima kukuruzne silaže napravljena je baždarna krivulja (+)-katehina koja je korištena kao standard. Temeljna otopina (+)-katehina pripremljena je otapanjem 0,2 g (+)-katehina u 10 mL 96%-tne otopine etanola te nadopunjena destiliranom vodom do oznake u odmjernoj tikvici od 100 mL. Od ovako pripremljene otopine pripremljena su različita razrjeđenja (0,02 mg/mL – 1 mg/mL) tako što je u odmjerne tikvice od 50 mL otpipetirano po 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,5 mL i 5 mL pripremljene otopine (+)-katehina, te su nadopunjene do oznake destiliranom vodom.

Prema postupku za određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima, određena je apsorbancija pripremljenih razrjeđenja otopine (+)-katehina. Iz dobivenih rezultata izrađena je kalibracijska krivulja, tj. krivulja ovisnosti vrijednosti apsorbancije o koncentraciji (+)-katehina.

Postupak za određivanje ukupnih flavonoida

U 4 mL destilirane vode dodan je 1 mL ekstrakta biološki obrađene kukuruzne silaže, potom 0,3 mL 5% natrijevog nitrita (otopiti 5 g u 100 mL destilirane vode) te je nakon pet minuta dodano 0,3 mL 10%-tne vodene otopine aluminij (III)-klorida heksahidrata (otopiti 10 g u 100 mL destilirane vode). Nakon 5 – 8 minuta dodano je 2 mL 1M natrijevog hidroksida te je reakcijska smjesa nadopunjena destiliranom vodom do 10 mL. Slijepa proba pripremana je na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodavao jednak volumen (1 mL) destilirane vode. Svi uzorci protreseni su na vorteksu te je odmah izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm.

Koncentracija flavonoida u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže određena je u odnosu na standardnu krivulju (+)-katehina (CE) i preračunata na suhu tvar biološki obrađene kukuruzne silaže ($\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$). Uzorci su analizirani u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti.

3.2.9. Određivanje koncentracije pojedinačnih fenolnih kiselina

Određivanje fenolnih spojeva tijekom biološke obrade kukuruzne silaže provedeno je na uređaju za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti - HPLC (Nexera XR, Shimadzu, Japan). Razdvajanje fenolnih spojeva provedeno je primjenom acetonitrila i metanola (50:50) kao mobilne faze A i 1%-tne fosfatne kiseline (H_3PO_4) kao mobilne faze B. Uvjeti primijenjene reverzno – fazne HPLC metode prikazani su u **Tablici 3**. Usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva i vremena zadržavanja standarda identificirani su individualni fenolni spojevi. Svi spojevi detektirani su na 280 nm, a u uzorcima su identificirani sljedeći spojevi: *p*-kumarinska kiselina (*p*CuA), ferulična kiselina (FA) i kafeinska kiselina (CA). Podaci analiza prikupljeni su i obrađeni pomoću softvera LabSolution (verzija 5.71SP2).

Koncentracija fenolnih spojeva određena je pomoću kalibracijske krivulje koja prikazuje ovisnost površine pika o koncentraciji određenog standarda. Kalibracijske krivulje bile su u rasponu od 5 – 20 mg/L za feruličnu i kafeinsku kiselinu te 50 – 100 mg/L za *p*-kumarinsku kiselinu.

Tablica 3 Uvjeti HPLC metode za određivanje fenolnih spojeva

Kolona:	Shim-pack GIST C18 (unutarnjeg promjera 250 x 4.6 mm, promjerčestica 5 μ m)
Detektor:	PDA (M20A)
Mobilna faza:	A = acetonitril:metanol (50:50), B = 1% H_3PO_4 0 min 5% A 95% B 25 min 30% A 70% B 35 min 40% A 60% B 40 min 48% A 52% B 50 min 70% A 30% B 55 min 100% A 0% B 70 min 5% A 95% B
Protok:	1 mL/min
Temperatura:	30°C
Volumen injektiranja:	20 μ L
Vrijeme u ravnoteženja kolone između analiza:	10 minuta

3.2.10. Plan pokusa i obrada podataka metodom odzivnih površina

Osnovni koraci u primjeni metode odzivnih površina kao tehnike optimizacije procesnih uvjeta:

- odabir nezavisnih varijabli (parametara, faktora) koje značajno utječu na promatrani proces s definiranim rasponom ispitivanih parametara (odabiru se prema cilju ispitivanja ili na temelju iskustva istraživača);
- izbor dizajna eksperimenata i provođenje eksperimenata prema ponuđenoj shemi kombinacije parametara (ovisna o primijenjenom dizajnu);
- aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom (polinomom) primjenom matematičko-statističkih modela;
- evaluacija prikladnosti modela;
- određivanje optimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli

U ovom radu Box-Behnkenov plan pokusa korišten je za procjenu utjecaja procesnih parametara biološke obrade kukuruzne silaže (broj plagova gljive *Trametes versicolor*, masa kukuruzne silaže, pH vrijednost i vrijeme fermentacije) i njihove interakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari (**Tablice 4**). Ispitivane varijable su prevedene u kodirane varijable prema izrazu:

$$X = \frac{x - \frac{(x_{\max} + x_{\min})}{2}}{\frac{(x_{\max} - x_{\min})}{2}} \quad (3)$$

Tablica 4 Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine biološku obradu kukuruzne silaže

Faktor	Donja razina	Centralna razina	Gornja Razina
Kodirane varijable	-1	0	1
X_1 - broj plagova	5	7	9
X_2 - masa kukuruzne silaže [g]	30	40	50
X_3 - pH	5	7	9
X_4 - vrijeme fermentacije [dani]	10	15	20

Prema Box-Behnkenovom planu pokusa provedeno je 27 eksperimenata ekstrakcije sa tri ponavljanja u centralnoj točki ispitivanog eksperimentalnog područja (**Tablica 5**).

Tablica 5 Uvjeti fermentacije na čvrstim nosačima prema Box-Behnkenovom planu pokusa

Broj eksperimenta	Broj plagova	<i>m</i> (kukuruzne silaže), g	pH	<i>t</i> (fermentacije), dan	<i>V</i> (pufer+pufer za naciepljivanje), mL
1.	7	40	7	15	110+10
2.	7	40	9	20	110+10
3.	5	40	7	20	110+10
4.	7	30	7	20	80+10
5.	5	40	9	15	110+10
6.	7	50	7	20	140+10
7.	5	40	5	15	110+10
8.	5	30	7	15	80+10
9.	7	40	7	15	110+10
10.	5	40	7	10	110+10
11.	9	40	9	15	110+10
12.	7	50	9	15	140+10
13.	7	30	9	15	80+10
14.	9	40	7	20	110+10
15.	7	40	5	10	110+10
16.	5	50	7	15	140+10
17.	9	30	7	15	80+10
18.	7	50	5	15	140+10
19.	7	30	7	10	80+10
20.	9	40	7	10	110+10
21.	7	30	5	15	80+10
22.	7	40	7	15	110+10
23.	9	40	5	15	110+10
24.	7	40	5	20	110+10
25.	7	40	9	10	110+10
26.	7	50	7	10	140+10
27.	9	50	7	15	140+10

Dobiveni eksperimentalni podaci su aproksimirani sa matematičkim modelom odzivnih površina tj. polinomom drugog reda u obliku:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (4)$$

gdje su :

Y - modelom predviđena odzivna funkcija

β_0 - konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

β_i - koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ii} - koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

β_{ij} - koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

$X_{i,j}$ - ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti)

Na osnovi dobivenog matematičkog modela (polinoma) konstruirana je odzivna površina koja omogućava vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane modele. Odzivna površina može se prikazati kao površina u 3D prostoru ili pomoću kontura odzivnih površina.

Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametara na promatrane procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametara provedena je primjenom softerskog paketa Design Expert 9.0.5. Prednost ovog programa je što može raditi s kodiranim i nekodiranim varijablama.

4. REZULTATI

Eksperimentalno dobiveni podaci i rezultati njihove obrade prikazani su u tablicama i dijagramima. Dizajn eksperimenata kao i statistička obrada dobivenih podataka u ispitivanim procesima provedeni su pomoću programskog paketa Design Expert 9.0.5., a korištena je metoda odzivnih površina prema Box-Behnkenovom planu pokusa.

4.1. ODREĐIVANJE SUHE TVARI

Nakon provedenih pokusa uzorci su sušeni 48 sati u vakuum sušioniku na 45 °C (Kambič, Slovenia, VS-50 SC) radi sprječavanja kontaminacije, nakon čega su smrznuti. Prije provođenja analiza u svim uzorcima biološki obrađene kukuruzne silaže određena je suha tvar na uređaju za određivanje vlage Mettler Toledo HR 73 brzom metodom na 180 °C, te je izražena kao srednja vrijednost dva određivanja (**Tablica 6**).

Tablica 6 Udio suhe tvari uzoraka biološki obrađene kukuruzne silaže

Uzorak	udio suhe tvari, %
1	89,95
2	97,45
3	89,44
4	90,85
5	86,86
6	89,99
7	81,81
8	90,27
9	93,09
10	91,82
11	87,92
12	85,37
13	88,68
14	91,29
15	97,25
16	94,85
17	98,47
18	97,53
19	90,63
20	91,54
21	96,75
22	96,37
23	93,74
24	95,98
25	85,00
26	95,70
27	98,21

4.2. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA FOLIN–CIOCALTEUOVOM METODOM

Tablica 7 Vrijednosti apsorbancija na valnoj duljini (λ) od 765 nm za pripadajuće koncentracije otopine galne kiseline (GAE)

c [mg _{GAE} /mL]	0	0,05	0,1	0,15	0,25	0,5	0,75	1
A_{sr}	0	0,06	0,11	0,16	0,28	0,56	0,80	1,08

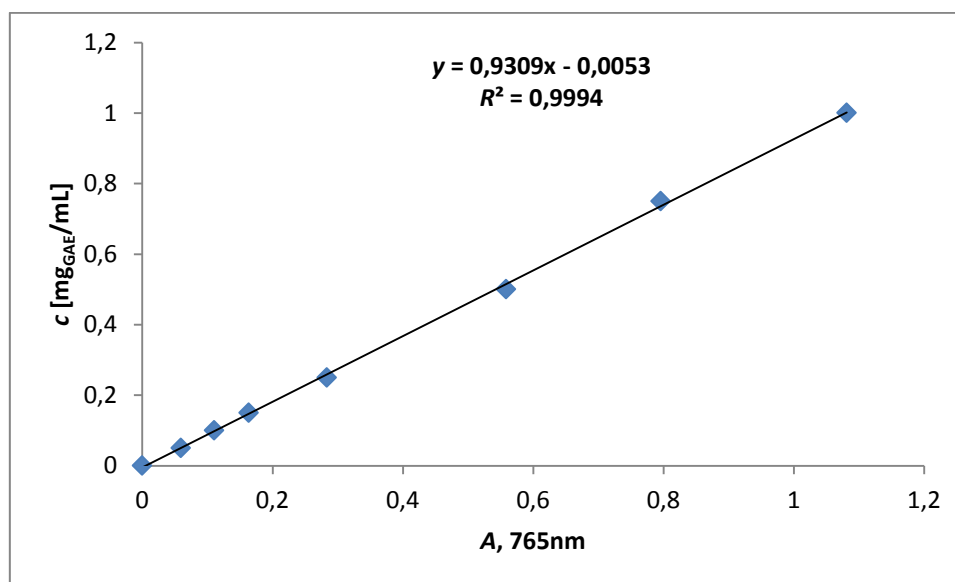
Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba:

$$y = 0,9309x - 0,0053 \quad (5)$$

odnosno:

$$c \text{ (ukupnih fenolnih tvari)} = 0,9309 \cdot A - 0,0053 \text{ [mg}_{GAE}\text{/mL]} \quad (6)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima prema izmjerenim vrijednostima apsorbancija.



Slika 12 Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari Folin–Ciocalteuovom metodom (standard: galna kiselina)

4.3. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA PRUSSIAN-BLUE METODOM

Tablica 8 Vrijednosti apsorbancija na valnoj duljini (λ) od 720 nm za pripadajuće koncentracije galne kiseline (GAE)

c [mg _{GAE} /mL]	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07
A_{sr}	0	0,21	0,36	0,54	0,75	0,94	1,21	1,31

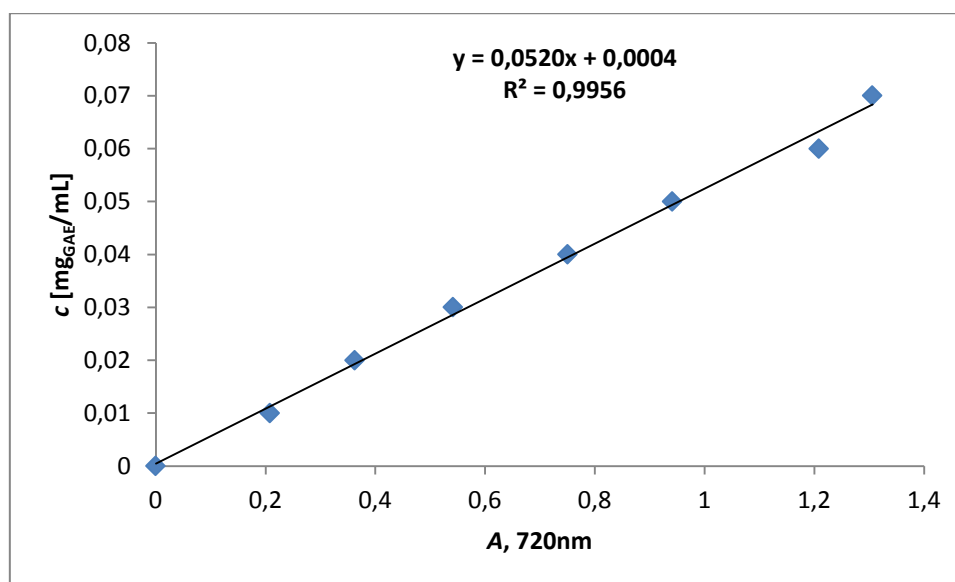
Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba :

$$y = 0,0520x + 0,0004 \quad (7)$$

odnosno:

$$c \text{ (ukupnih fenolnih tvari)} = 0,0520 \cdot A + 0,0004 \text{ [mg}_{GAE}\text{/mL]} \quad (8)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih fenola u ekstraktima prema izmjerenim vrijednostima apsorbancija.



Slika 13 Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih fenolnih tvari Prussian Blue metodom (standard: galna kiselina)

4.4. KALIBRACIJSKA KRIVULJA ZA ODREĐIVANJE UKUPNIH FLAVONOIDA

Tablica 9 Vrijednosti apsorbancija na valnoj duljini (λ) od 510 nm za pripadajuće koncentracije otopine (+)-katehina (CE)

c [mg _{CE} /mL]	0	0,02	0,04	0,06	0,10	0,20
A_{sr}	0	0,06	0,11	0,17	0,28	0,55

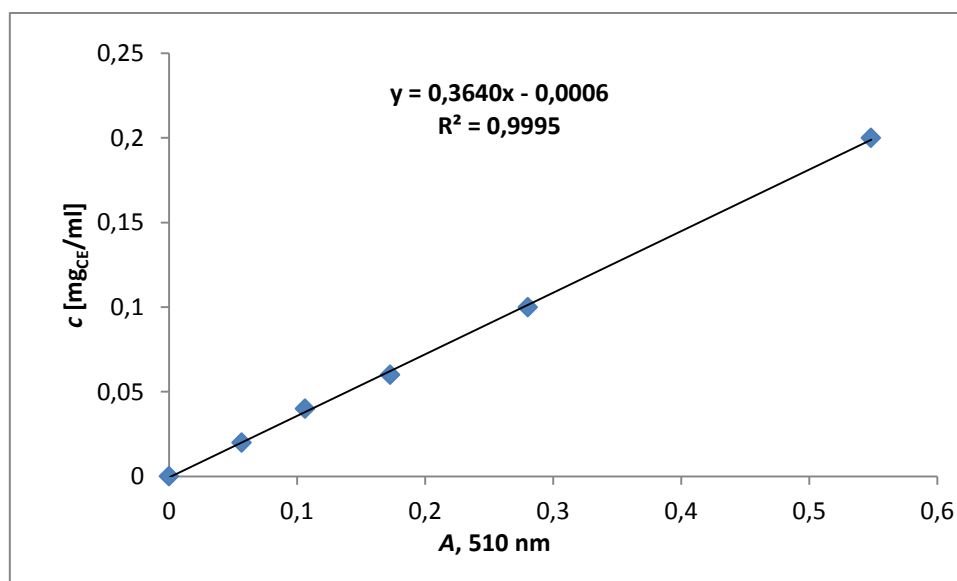
Metodom linearne regresije dobivena je jednadžba:

$$y = 0,3640x - 0,0006 \quad (9)$$

odnosno:

$$c \text{ (ukupnih flavonoida)} = 0,3640 \cdot A - 0,0006 \text{ [mg}_{CE}\text{/mL]} \quad (10)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima prema izmjerenim vrijednostima apsorbancija.



Slika 14 Kalibracijska krivulja za određivanje ukupnih flavonoida (standard: (+)- katehin)

4.5. REGRESIJSKE JEDNADŽBE ZA IZRAČUNAVANJE MASENE KONCENTRACIJE POJEDINAČNIH FENOLNIH KISELINA

p-kumarinska kiselina

Metodom linearne regresije dobivena je jednačica:

$$y = 1 \cdot 10^{-05}x + 0,8584 \quad (11)$$

odnosno:

$$c(p - kumarinska\ kiselina) = 1 \cdot 10^{-05} \cdot P_p + 0,8584 \text{ [mg/mL]} \quad (12)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije *p*-kumarinske kiseline u ekstraktima na temelju određenih površina pikova (P_p).

Ferulična kiselina

Metodom linearne regresije dobivena je jednačica:

$$y = 2 \cdot 10^{-05}x + 0,1446 \quad (13)$$

odnosno:

$$c(ferulična\ kiselina) = 2 \cdot 10^{-05} \cdot P_p + 0,1446 \text{ [mg/mL]} \quad (14)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije ferulične kiseline u ekstraktima na temelju određenih površina pikova (P_p).

Kafeinska kiselina

Metodom linearne regresije dobivena je jednačica:

$$y = 2 \cdot 10^{-05}x + 0,8625 \quad (15)$$

odnosno:

$$c(kafeinska\ kiselina) = 2 \cdot 10^{-05} \cdot P_p + 0,8625 \text{ [mg/mL]} \quad (16)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije kafeinske kiseline u ekstraktima na temelju određenih površina pikova (P_p).

4.6. IZRAČUNAVANJE MASENOG UDJELA FENOLNIH SPOJEVA

Prema jednadžbama (6, 8, 10, 12, 14 i 16) izračunate su koncentracije fenolnih spojeva [mg/mL] koje su preračunate na suhu tvar uzorka na slijedeći način:

$$C = \frac{c \cdot V}{m_{uz} \cdot w_{s.t.}} [\text{mg/g}_{s.t.}] \quad (17)$$

gdje je:

C – maseni udio fenolnih spojeva [mg/g_{s.t.}]

c – masena koncentracija fenolnih spojeva [mg/mL]

V – volumen otapala [mL]

m_{uz} – masa uzorka iz kojeg su se ekstrahirali fenoli [g]

$w_{s.t.}$ – udio suhe tvari [%]

4.7. UTJECAJ PROCESNIH UVJETA BIOLOŠKE OBRADJE NA EKSTRAKTIBILNOST UKUPNIH FENOLNIH TVARI, FLAVONOIDA I FENOLNIH KISELINA IZ BIOLOŠKI OBRAĐENE KUKURUZNE SILAŽE TE ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA BIOLOŠKE OBRADJE METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Eksperimentalno je ispitan utjecaj četiri procesna uvjeta (faktora) biološke obrade kukuruzne silaže u tri razine (broj plagova gljive *Trametes versicolor*: 5-7-9, masa kukuruzne silaže: 30-40-50 g, pH vrijednost: 5-7-9 i vrijeme fermentacije: 10-15-20 dana) i njihove interakcije na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida iz kukuruzne silaže. Dizajn eksperimenata (27 eksperimenata), kao i statistička obrada dobivenih podataka u ispitivanim procesima, provedeni su pomoću programskog paketa Design Expert 9.0.5., a korištena je Box-Behnken metoda odzivnih površina. Udio ukupnih fenolnih spojeva (FC i PB metoda) te udio ukupnih flavonoida određen je spektrofotometrijski, dok su pojedinačne fenolne kiseline određene HPLC metodom.

Tablica 10 Srednje vrijednosti masenih udjela ukupnih fenolnih tvari (C_{UFT}) i ukupnih flavonoida (C_{UFL}) u ekstraktima (ekstrakcija na 80 °C/50 %, v/v ETOH/120 min) dobivenim iz biološki obrađene kukuruzne silaže pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* pri različitim uvjetima fermentacije (broj plagova - P ; masa kukuruzne silaže – m , pH i vrijeme fermentacije- t) prema Box-Behnkenovom dizajnu (eksperimentalna matrica)

Broj eksperimenta	Faktor X_1 , P	Faktor X_2 , m [g]	Faktor X_3 , pH	Faktor X_4 , t [dani]	C_{UFT_FC} [mg _{GAE} /g _{s.t.}]	C_{UFT_PB} [mg _{GAE} /g _{s.t.}]	C_{UFL} [mg _{CE} /g _{s.t.}]
1	5	30	7	15	6,14	0,54	0,83
2	9	30	7	15	9,47	0,23	0,70
3	7	40	7	15	5,96	0,08	1,47
4	7	40	7	15	5,93	0,21	0,64
5	9	40	7	10	6,76	0,24	0,31
6	7	40	9	10	5,22	0,14	1,07
7	5	40	7	10	4,33	0,19	0,50
8	9	50	7	15	6,27	0,35	0,60
9	7	30	7	20	5,85	0,55	0,70
10	5	40	9	15	5,57	0,39	0,72
11	9	40	5	15	6,88	0,24	0,36
12	7	30	5	15	5,94	0,27	0,36
13	7	50	7	10	6,47	0,26	0,39
14	7	40	9	20	6,07	0,33	0,68
15	9	40	7	20	4,93	0,23	0,50
16	7	40	5	20	5,58	0,22	0,58
17	7	40	5	10	4,65	0,21	0,65
18	5	40	7	20	3,20	0,19	0,42
19	7	50	9	15	5,43	0,24	0,49
20	7	50	7	20	6,21	0,36	0,57
21	7	30	9	15	4,84	0,20	0,59
22	7	50	5	15	4,30	0,19	0,45
23	7	30	7	10	3,74	0,19	0,40
24	5	50	7	15	2,91	0,25	0,56
25	7	40	7	15	5,67	0,11	1,06
26	5	40	5	15	5,28	0,35	0,40
27	9	40	9	15	4,76	0,26	0,66

FC-ukupne fenolne tvari određene Folin-Ciocalteuovom metodom

PB – ukupne fenolne tvari određene Prussian Blue metodom

Tablica 11 Srednje vrijednosti masenih udjela fenolnih kiselina (*p*-kumarinska: *p*-CuA; ferulična kiselina: FA; kafeinska kiselina: CA) u ekstraktima (ekstrakcija na 80 °C/50 %, v/v EtOH/120 min) dobivenim iz biološki obrađene kukuruzne silaže pomoću gljive bijelog truljenja *T. Versicolor* pri različitim uvjetima fermentacije (broj plagova spora - *P*; masa kukuruzne silaže – *m*, *pH* i vrijeme fermentacije- *t*) prema Box-Behnkenovom dizajnu (eksperimentalna matrica)

Broj eksperimenta	Faktor X_1 , <i>P</i>	Faktor X_2 , <i>m</i> [g]	Faktor X_3 , <i>pH</i>	Faktor X_4 , <i>t</i> [dani]	C_{p-CuA} [mg/g _{s.t.}]	C_{FA} [mg/g _{s.t.}]	C_{CA} [mg/g _{s.t.}]
1	5	30	7	15	0,08	0,04	0,02
2	9	30	7	15	0,28	0,27	0,06
3	7	40	7	15	0,35	0,15	0,09
4	7	40	7	15	0,26	0,12	0,14
5	9	40	7	10	0,36	0,26	0,11
6	7	40	9	10	0,26	0,11	0,11
7	5	40	7	10	0,09	0,01	0,03
8	9	50	7	15	0,08	0,06	0,02
9	7	30	7	20	0,08	0,05	0,02
10	5	40	9	15	0,09	0,07	0,02
11	9	40	5	15	0,09	0,07	0,02
12	7	30	5	15	0,33	0,24	0,11
13	7	50	7	10	0,30	0,25	0,11
14	7	40	9	20	0,26	0,11	0,11
15	9	40	7	20	0,12	0,01	0,03
16	7	40	5	20	0,08	0,04	0,03
17	7	40	5	10	0,22	0,11	0,11
18	5	40	7	20	0,14	0,01	0,03
19	7	50	9	15	0,12	0,08	0,04
20	7	50	7	20	0,22	0,08	0,03
21	7	30	9	15	0,16	0,01	0,04
22	7	50	5	15	0,26	0,11	0,10
23	7	30	7	10	0,11	0,01	0,04
24	5	50	7	15	0,12	0,01	0,03
25	7	40	7	15	0,30	0,26	0,10
26	5	40	5	15	0,24	0,07	0,12
27	9	40	9	15	0,29	0,14	0,14

4.7.1. Modeliranje procesa biološke obrade kukuruzne silaže pomoću *Trametes versicolor*

Aproksimacijom dobivenih eksperimentalnih podataka matematičkim modelom (kvadratnim polinomom) prema jednadžbi (4) dobivena je odzivna funkcija odnosno funkcionalna ovisnost sadržaja ukupnih fenolnih tvari (Y_{UFT}), ukupnih flavonoida (Y_{UFL}) i fenolnih kiselina (p -kumarinske: p -CuA; ferulične kiseline - FA i kafeinske kiseline - CA) o ispitivanim procesnim uvjetima (i njihovoj interakciji) biološke obrade kukuruzne silaže pomoću *Trametes versicolor* i o njihovoj interakciji kako slijedi:

$$Y_{UFT_FC} = 5,85 + 0,97 \cdot X_1 - 0,37 \cdot X_2 - 0,06 \cdot X_3 + 0,06 \cdot X_4 - 0,065 \cdot X_1^2 + 0,07 \cdot X_2^2 - 0,31 \cdot X_3^2 - 0,50 \cdot X_4^2 + 0,01 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,60 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,18 \cdot X_1 \cdot X_4 + 0,56 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,59 \cdot X_2 \cdot X_4 - 0,02 \cdot X_3 \cdot X_4 \quad (18)$$

$$Y_{UFT_PB} = 0,13 - 0,03 \cdot X_1 - 0,03 \cdot X_2 + 0,01 \cdot X_3 + 0,05 \cdot X_4 + 0,09 \cdot X_1^2 + 0,11 \cdot X_2^2 + 0,04 \cdot X_3^2 - 0,05 \cdot X_4^2 + 0,10 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,01 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,001 \cdot X_1 \cdot X_4 + 0,03 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,06 \cdot X_2 \cdot X_4 + 0,04 \cdot X_3 \cdot X_4 \quad (19)$$

$$Y_{UFL} = 1,05 - 0,025 \cdot X_1 - 0,04 \cdot X_2 + 0,12 \cdot X_3 + 0,01 \cdot X_4 - 0,27 \cdot X_1^2 - 0,26 \cdot X_2^2 - 0,21 \cdot X_3^2 - 0,24 \cdot X_4^2 + 0,05 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,01 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,07 \cdot X_1 \cdot X_4 - 0,05 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,03 \cdot X_2 \cdot X_4 - 0,08 \cdot X_3 \cdot X_4 \quad (20)$$

$$Y_{p-CuA} = 0,30 + 0,04 \cdot X_1 + 0,06 \cdot X_2 - 0,04 \cdot X_3 - 0,04 \cdot X_4 - 0,09 \cdot X_1^2 - 0,07 \cdot X_2^2 - 0,03 \cdot X_3^2 - 0,05 \cdot X_4^2 - 0,06 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,09 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,07 \cdot X_1 \cdot X_4 + 0,01 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,01 \cdot X_2 \cdot X_4 + 0,03 \cdot X_3 \cdot X_4 \quad (21)$$

$$Y_{FA} = 0,17 + 0,05 \cdot X_1 - 0,00 \cdot X_2 - 0,01 \cdot X_3 - 0,04 \cdot X_4 - 0,05 \cdot X_1^2 - 0,03 \cdot X_2^2 - 0,03 \cdot X_3^2 - 0,05 \cdot X_4^2 - 0,05 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,02 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,06 \cdot X_1 \cdot X_4 + 0,05 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,05 \cdot X_2 \cdot X_4 + 0,02 \cdot X_3 \cdot X_4 \quad (22)$$

$$Y_{CA} = 0,17 + 0,05 \cdot X_1 - 0,00 \cdot X_2 - 0,01 \cdot X_3 - 0,04 \cdot X_4 - 0,05 \cdot X_1^2 - 0,03 \cdot X_2^2 - 0,03 \cdot X_3^2 - 0,05 \cdot X_4^2 - 0,05 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,02 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,06 \cdot X_1 \cdot X_4 + 0,05 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0,05 \cdot X_2 \cdot X_4 + 0,02 \cdot X_3 \cdot X_4 \quad (23)$$

gdje su:

Y - modelom predviđen maseni udio fenolnih tvari [mg/g_{s.t.}]

X_1 – ispitivani broj plagova

X_2 – ispitivana masa kukuruzne silaže [g]

X_3 – pH vrijednost otapala

X_4 - ispitivano vrijeme biološke obrade [dan]

UKUPNE FENOLNE TVARI

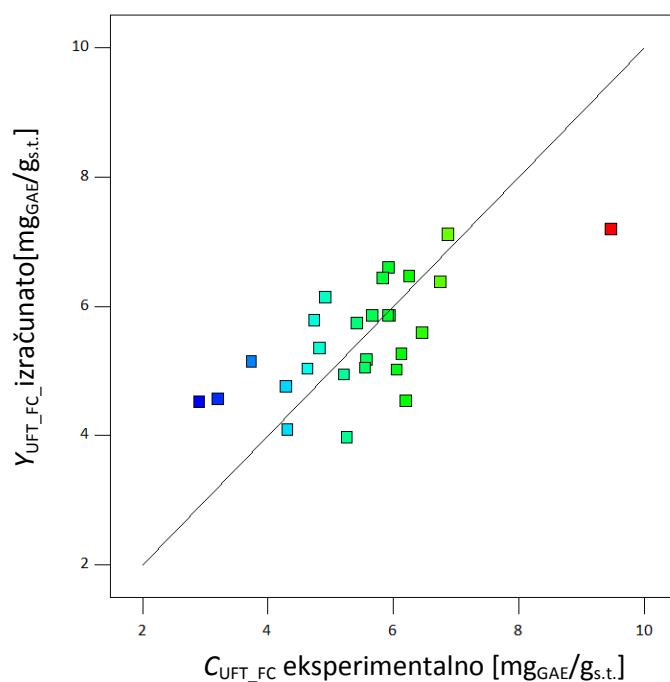
Tablica 12 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih fenolnih tvari Folin-Ciocalteuovom metodom, u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	Df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
Model	19,22	14	1,37	0,70^{ns}	0,7438
X ₁ -broj plagova	11,31	1	11,31	5,73*	0,0338
X ₂ - masa	1,62	1	1,62	0,82^{ns}	0,3829
X ₃ -pH	0,05	1	0,05	0,02^{ns}	0,8815
X ₄ -vrijeme	0,04	1	0,04	0,02^{ns}	0,8929
X ₁ X ₂	0,00	1	0,00	0,00^{ns}	0,9918
X ₁ X ₃	1,46	1	1,46	0,74^{ns}	0,4062
X ₁ X ₄	0,12	1	0,12	0,06^{ns}	0,8057
X ₂ X ₃	1,24	1	1,24	0,63^{ns}	0,4437
X ₂ X ₄	1,40	1	1,40	0,71^{ns}	0,4166
X ₃ X ₄	0,00	1	0,00	0,00^{ns}	0,9748
X ₁ ²	0,02	1	0,02	0,01^{ns}	0,9163
X ₂ ²	0,03	1	0,03	0,01^{ns}	0,9115
X ₃ ²	0,52	1	0,52	0,27^{ns}	0,6159
X ₄ ²	1,33	1	1,33	0,67^{ns}	0,4276
Ostatak	23,67	12	1,97		
Nedostatak modela	23,62	10	2,36	95,34*	0,0104
Pogreška	0,050	2	0,03		
Ukupno	42,89	26			
R	0,67				

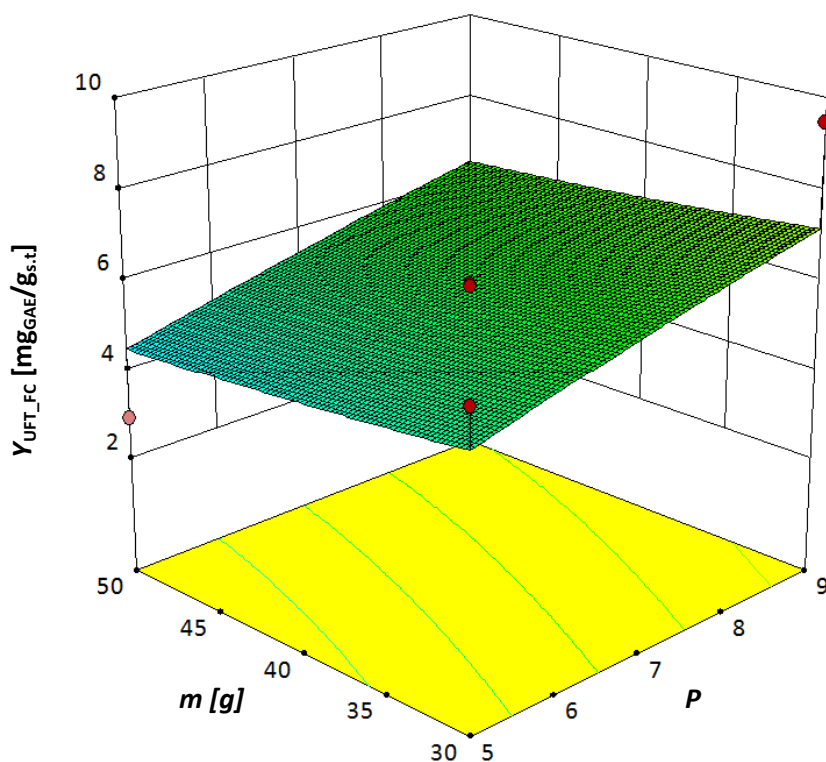
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df-stupnjevi slobode; MS-varijanca

* *utjecaj faktora je statistički značajan uz p =0,05*

^{ns} *utjecaj faktora nije statistički značajan*



Slika 15 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih fenolnih tvari prema FC metodi i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu



Slika 16 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih fenola određenih FC metodom (Y_{UFT_FC}) u ovisnosti o masi kukuruzne silaže (m) i broju plagova (P) pri konstantnom vremenu fermentacije u trajanju 15 dana i pH 7

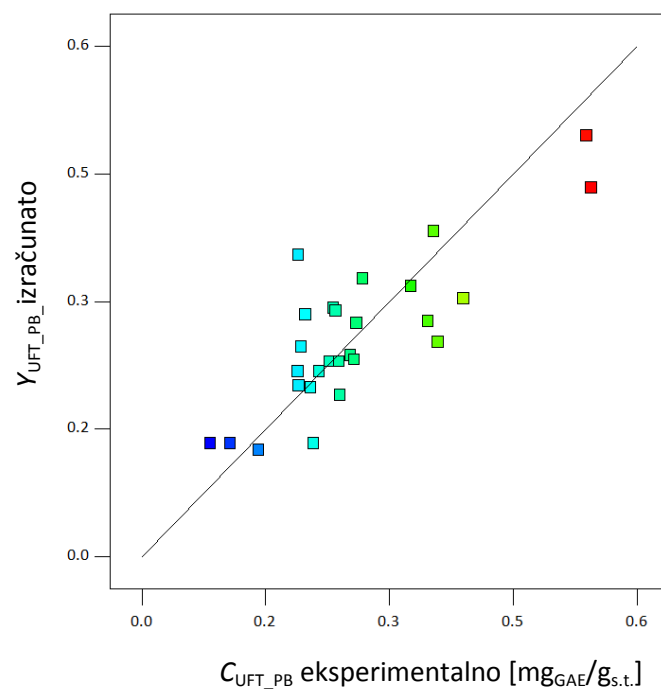
Tablica 13 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih fenolnih tvari određenih Prussian-Blue metodom, u ekstraktima biološki kukuruzne silaže, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	Df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
Model	0,21	14	0,02	1,79 ^{ns}	0,1593
X ₁ -broj plagova	0,01	1	0,01	1,30 ^{ns}	0,2763
X ₂ - masa	0,01	1	0,01	1,01 ^{ns}	0,3348
X ₃ -pH	0,00	1	0,00	0,07 ^{ns}	0,7904
X ₄ -vrijeme	0,03	1	0,03	4,06 ^{ns}	0,0670
X ₁ X ₂	0,04	1	0,04	5,07*	0,0438
X ₁ X ₃	0,00	1	0,00	0,02 ^{ns}	0,8954
X ₁ X ₄	0,00	1	0,00	0,00	0,9817
X ₂ X ₃	0,00	1	0,00	0,39 ^{ns}	0,5418
X ₂ X ₄	0,02	1	0,02	1,96 ^{ns}	0,1872
X ₃ X ₄	0,00	1	0,00	0,91 ^{ns}	0,3593
X ₁ ²	0,05	1	0,05	5,39*	0,0386
X ₂ ²	0,07	1	0,07	7,93*	0,0156
X ₃ ²	0,00	1	0,01	0,81 ^{ns}	0,3859
X ₄ ²	0,01	1	0,01	1,37 ^{ns}	0,2643
Ostatak	0,10	12	0,01		
Nedostatak modela	0,09	10	0,01	2,04 ^{ns}	0,3733
Pogreška	0,01	2	0,00		
Ukupno	0,31	26			
R	0,82				

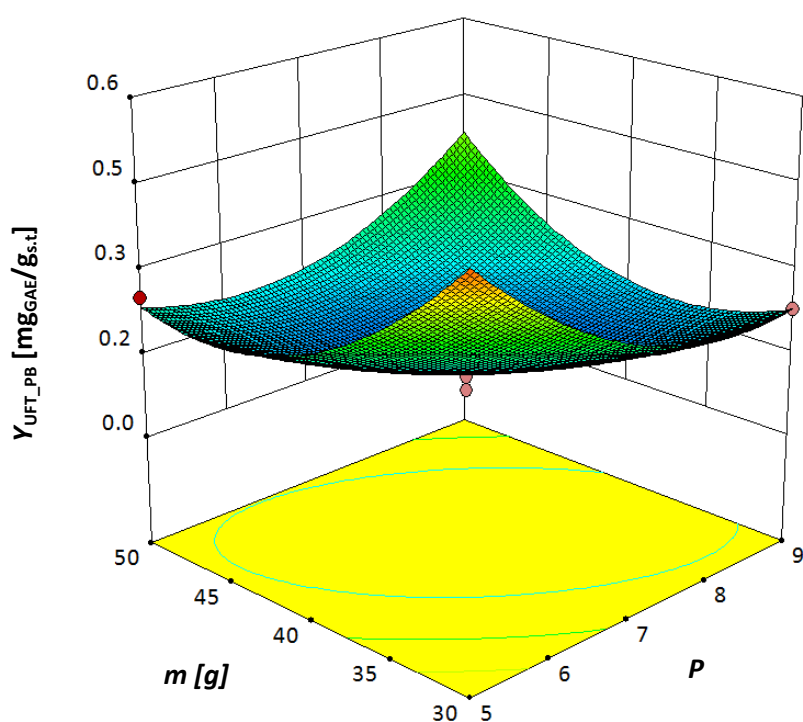
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df-stupnjevi slobode; MS-varijanca

* utjecaj faktora je statistički značajan uz p = 0,05

^{ns} utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 17 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih fenolnih tvari prema PB metodi i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu



Slika 18 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih fenola određenih PB metodom (Y_{UFT_PB}) u ovisnosti o masi kukuruzne silaže (m) i broju plagova (P) pri konstantnom vremenu fermentacije u trajanju 15 dana i pH 7

UKUPNI FLAVONOIDI

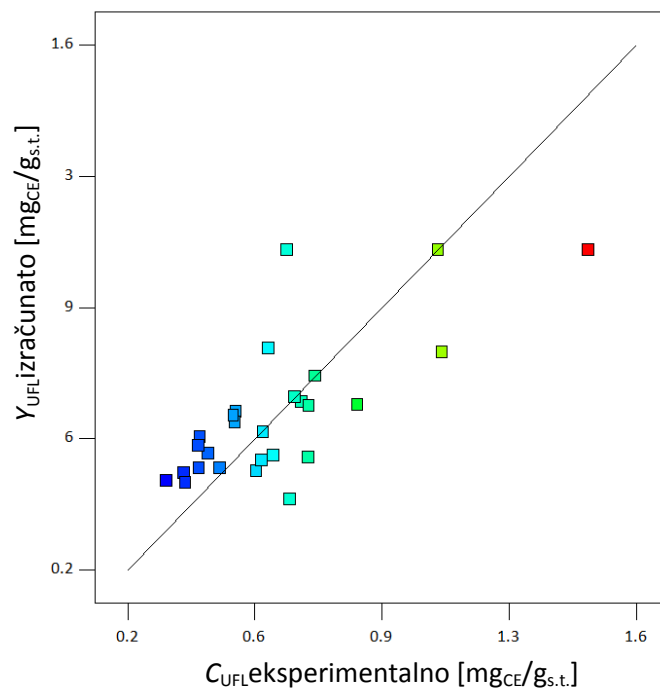
Tablica 14 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ukupnih flavonoida, u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
Model	0,93	14	0,07	1,04^{ns}	0,4813
X ₁ -broj plagova	0,01	1	0,01	0,12^{ns}	0,7398
X ₂ - masa	0,02	1	0,02	0,34^{ns}	0,5729
X ₃ -pH	0,17	1	0,17	2,64^{ns}	0,1300
X ₄ -vrijeme	0,00	1	0,01	0,02^{ns}	0,8814
X ₁ X ₂	0,01	1	0,01	0,13^{ns}	0,7264
X ₁ X ₃	0,00	1	0,00	0,00^{ns}	0,9707
X ₁ X ₄	0,02	1	0,02	0,28^{ns}	0,6083
X ₂ X ₃	0,01	1	0,01	0,15^{ns}	0,7058
X ₂ X ₄	0,00	1	0,00	0,06^{ns}	0,8103
X ₃ X ₄	0,02	1	0,02	0,38^{ns}	0,5481
X ₁ ²	0,39	1	0,39	6,09*	0,0296
X ₂ ²	0,36	1	0,36	5,56*	0,0362
X ₃ ²	0,25	1	0,25	3,85^{ns}	0,0735
X ₄ ²	0,32	1	0,32	4,97*	0,0456
Ostatak	0,77	12	0,06		
Nedostatak modela	0,42	10	0,04	0,25^{ns}	0,9478
Pogreška	0,34	2	0,17		
Ukupno	1,69	26			
R	0,74				

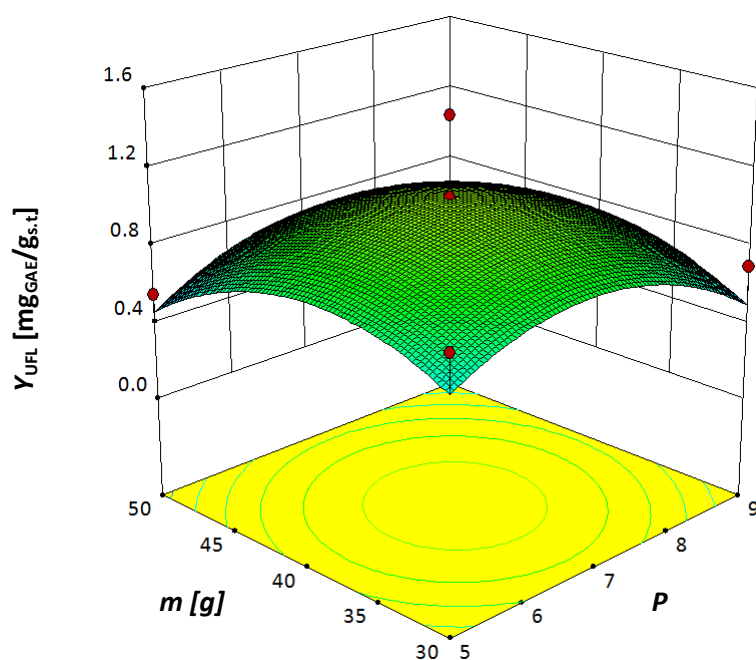
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df-stupnjevi slobode; MS-varijanca

* utjecaj faktora je statistički značajan uz p =0,05

^{ns} utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 19 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ukupnih flavonoida i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu



Slika 20 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ukupnih flavonoida (Y_{UFL}) u ovisnosti o masi kukuruzne silaže (m) i broju plagova pri konstantnom vremenu fermentacije u trajanju 15 dana i pH 7

FENOLNE KISELINE**1. *p*-kumarinska kiselina**

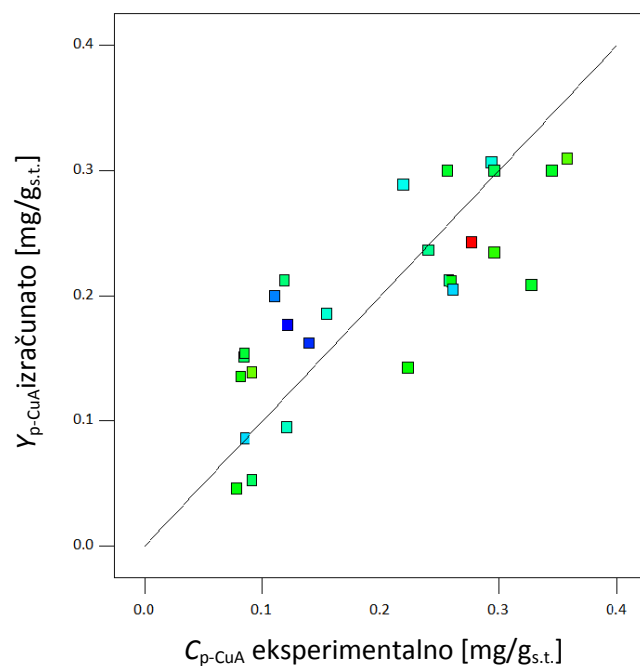
Tablica 15 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa *p*-kumarinske kiseline u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	<i>SS</i>	<i>Df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i> vrijednost	<i>Prob > F</i> (<i>p</i> < 0,05)
Model	0,15	14	0,01	1,58^{ns}	0,2170
X_1 -broj plagova	0,02	1	0,02	2,61^{ns}	0,1322
X_2 - masa	0,00	1	0,00	0,06^{ns}	0,8106
X_3 -pH	0,00	1	0,00	0,03^{ns}	0,8709
X_4 -vrijeme	0,01	1	0,01	2,06^{ns}	0,1767
$X_1 X_2$	0,01	1	0,01	2,07^{ns}	0,1763
$X_1 X_3$	0,03	1	0,03	4,46^{ns}	0,0563
$X_1 X_4$	0,02	1	0,02	3,05^{ns}	0,1063
$X_2 X_3$	0,00	1	0,00	0,03^{ns}	0,8581
$X_2 X_4$	0,00	1	0,00	0,08^{ns}	0,7830
$X_3 X_4$	0,00	1	0,00	0,68^{ns}	0,4268
X_1^2	0,04	1	0,04	5,53*	0,0366
X_2^2	0,023	1	0,02	3,26^{ns}	0,0959
X_3^2	0,01	1	0,01	0,78^{ns}	0,3935
X_4^2	0,02	1	0,02	2,10^{ns}	0,1732
Ostatak	0,08	12	0,01		
Nedostatak modela	0,08	10	0,01	4,05^{ns}	0,2143
Pogreška	0,00	2	0,00		
Ukupno	0,24	26			
<i>R</i>	0,80				

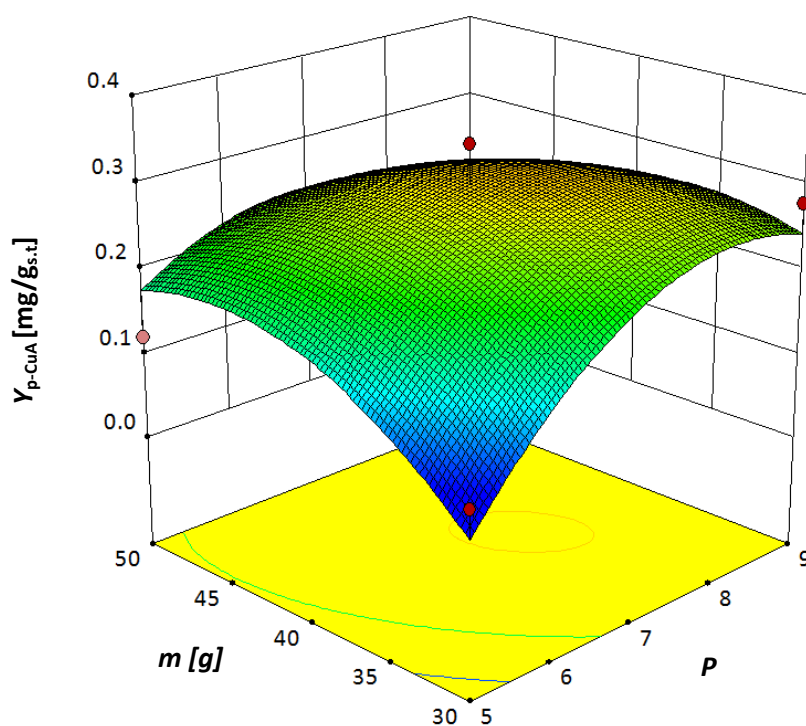
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; *df*-stupnjevi slobode; *MS*-varijanca

* *utjecaj faktora je statistički značajan uz $p = 0,05$*

^{ns} *utjecaj faktora nije statistički značajan*



Slika 21 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela *p*-kumarinske kiseline i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu



Slika 22 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos *p*-kumarinske kiseline (Y_{p-CuA}) u ovisnosti o masi kukuruzne silaže (m) i broju plagova (P) pri konstantnom vremenu fermentacije u trajanju 15 dana i pH 7

2. Ferulična kiselina

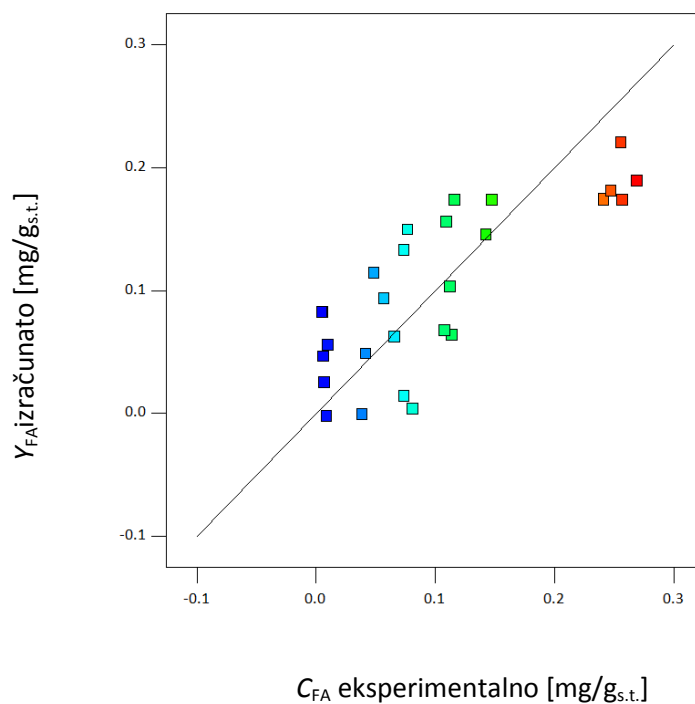
Tablica 16 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa ferulične kiseline u ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
Model	0,11	14	0,01	1,31^{ns}	0,3235
X ₁ -broj plagova	0,03	1	0,03	4,87*	0,0475
X ₂ - masa	0,00	1	0,00	0,02^{ns}	0,8948
X ₃ -pH	0,00	1	0,00	0,16^{ns}	0,6952
X ₄ -vrijeme	0,02	1	0,02	2,57^{ns}	0,1352
X ₁ X ₂	0,01	1	0,01	1,28^{ns}	0,2807
X ₁ X ₃	0,00	1	0,00	0,15^{ns}	0,7073
X ₁ X ₄	0,02	1	0,02	2,40^{ns}	0,1470
X ₂ X ₃	0,01	1	0,01	1,59^{ns}	0,2311
X ₂ X ₄	0,01	1	0,011	1,75^{ns}	0,2111
X ₃ X ₄	0,00	1	0,00	0,19^{ns}	0,6717
X ₁ ²	0,02	1	0,02	2,37^{ns}	0,1493
X ₂ ²	0,00	1	0,00	0,75^{ns}	0,4033
X ₃ ²	0,01	1	0,01	0,88^{ns}	0,3663
X ₄ ²	0,013	1	0,013	2,02^{ns}	0,1807
Ostatak	0,08	12	0,01		
Nedostatak modela	0,06	10	0,01	1,19^{ns}	0,5414
Pogreška	0,01	2	0,01		
Ukupno	0,19	26			
R	0,78				

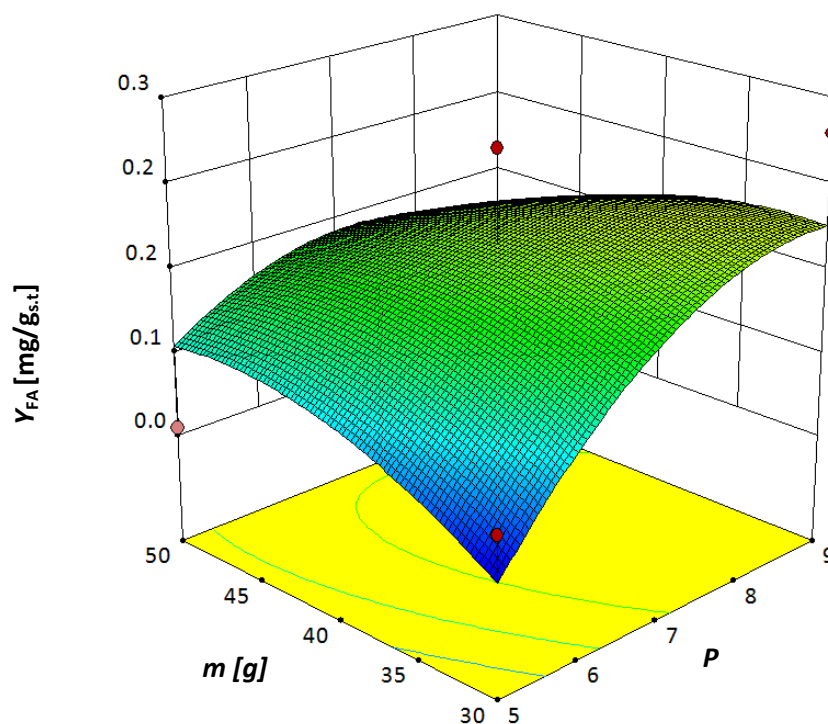
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df-stupnjevi slobode; MS-varijanca

* *utjecaj faktora je statistički značajan uz p = 0,05*

^{ns} *utjecaj faktora nije statistički značajan*



Slika 23 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela ferulične kiseline i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu



Slika 24 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos ferulične kiseline (Y_{FA}) u ovisnosti o masi kukuruzne silaže (m) i broju plagova (P) pri konstantnom vremenu fermentacije u trajanju 15 dana i pH 7

3. Kafeinska kiselina

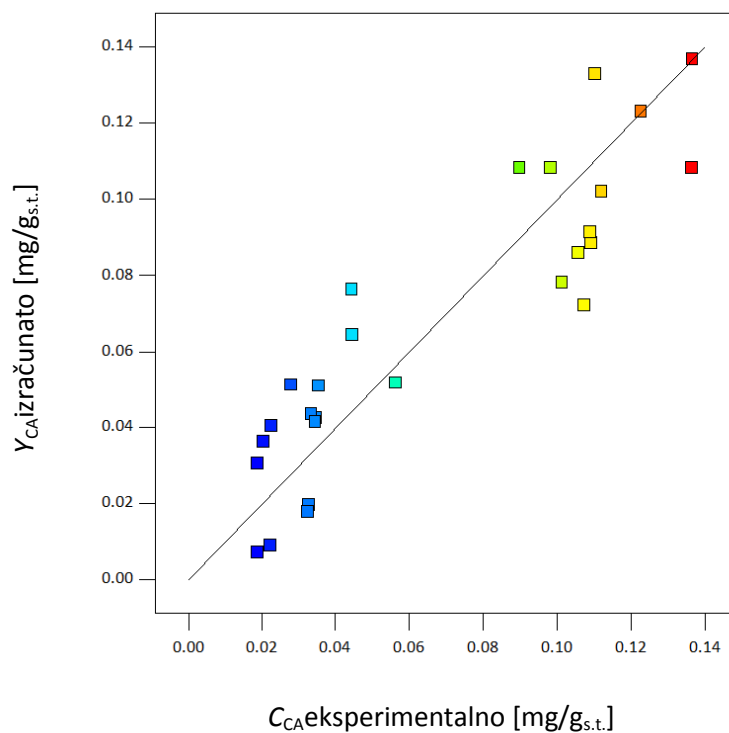
Tablica 17 Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određenog prinosa kafeinske kiselineu ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže, polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F vrijednost	Prob > F (p < 0,05)
Model	0,04	14	0,00	3,75*	0,0137
X ₁ -broj plagova	0,00	1	0,00	1,42^{ns}	0,2568
X ₂ - masa	0,00	1	0,00	0,34^{ns}	0,5705
X ₃ -pH	0,00	1	0,00	0,10^{ns}	0,7595
X ₄ -vrijeme	0,01	1	0,01	7,49*	0,0180
X ₁ X ₂	0,00	1	0,00	0,83^{ns}	0,3794
X ₁ X ₃	0,01	1	0,01	17,26*	0,0013
X ₁ X ₄	0,00	1	0,00	2,25^{ns}	0,1592
X ₂ X ₃	0,00	1	0,00	0,01^{ns}	0,9121
X ₂ X ₄	0,00	1	0,00	1,40^{ns}	0,2601
X ₃ X ₄	0,00	1	0,00	2,19^{ns}	0,1650
X ₁ ²	0,01	1	0,01	9,63*	0,0091
X ₂ ²	0,01	1	0,01	10,49*	0,0071
X ₃ ²	0,00	1	0,00	0,03^{ns}	0,8603
X ₄ ²	0,00	1	0,00	3,19^{ns}	0,0995
Ostatak	0,01	12	0,00		
Nedostatak modela	0,01	10	0,00	1,19^{ns}	0,5409
Pogreška	0,00	2	0,00		
Ukupno	0,05	26	0,00		
R	0,90				

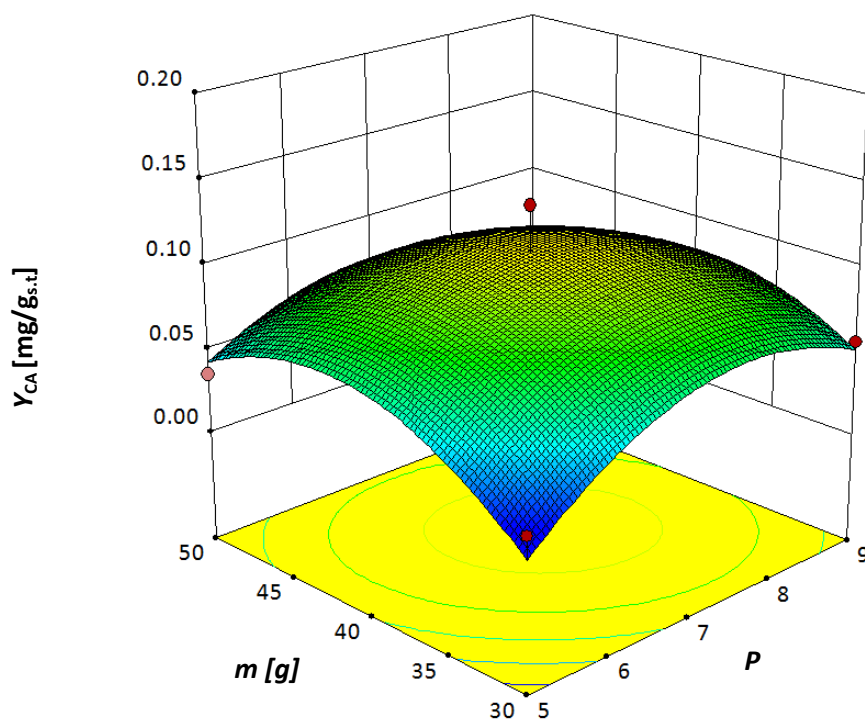
SS-suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df-stupnjevi slobode; MS-varijanca

* utjecaj faktora je statistički značajan uz p =0,05

^{ns}utjecaj faktora nije statistički značajan



Slika 25 Međusobna ovisnost svih eksperimentalno određenih masenih udjela kafeinske kiseline i izračunatih prema aproksimacijskom modelu tj. kvadratnom polinomu



Slika 26 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za prinos kafeinske kiseline (Y_{CA}) u ovisnosti o masi kukuruzne silaže (m) i broju plagova (P) pri konstantnom vremenu fermentacije u trajanju 15 dana i pH 7

4.7.2. Optimiranje procesa biološke obrade kukuruzne silaže pomoću *T. versicolor*

S ciljem određivanja optimalnih uvjeta biološke obrade kukuruzne silaže pomoću *T. versicolor* za dobivanje maksimalnog prinosa analiziranih fenolnih spojeva provedena je numerička optimizacija pomoću programa Design Expert 9.0.5. Pri tome dobiveno je više mogućih rješenja odnosno kombinacija ispitivanih varijabli a kao najbolje rješenje odabrani su oni uvjeti biološke obrade uzoraka pri kojima je funkcija poželjnosti (eng. Desirability), kao kriterij uspješnosti optimizacije bila bliže 1.

Tablica 18 Numerička optimizacija procesnih uvjeta (broj plagova: *P*; masa silaže: *m*; pH vrijednost; vrijeme fermentacije: *t*) biološke obrade kukuruzne silaže za dobivanje maksimalnog prinosa fenolnih tvari (u tablici prikazane vrijednosti izračunate modelom- *Y*)

	<i>P</i>	<i>m</i> [g]	pH	<i>t</i> [dan]	<i>Y</i> [mg/g]	Poželjnost
UFT_FC	9	30	5	17	8,21	0,90
UFT_PB	5	30	8	20	0,683	1,00
UFL	7	40	8	15	1,061	0,92
p-CuA	9	40	9	12	0,331	0,98
FA	9	35	6	12	0,22	0,96
CA	9	40	9	10	0,14	1,00

5. RASPRAVA

Učinkovitost procesa biološke obrade kukuruzne silaže pomoću *Trametes versicolor* ovisi o brojnim parametrima koji mogu djelovati zavisno ili nezavisno. Kako bi se ispitao utjecaj glavnih parametara procesa i odredili optimalni procesni parametri, potrebno je provesti veliki broj eksperimenata u što više mogućih kombinacija ispitivanih parametara. Međutim, metoda odzivnih površina kao skup matematičkih i statističkih tehnika pokazala se kao koristan alat u razvoju, poboljšanju i optimizaciji procesa uz smanjen broj potrebnih eksperimenata. Ova metoda omogućuje planiranje pokusa tako da se provode samo neki eksperimenti s određenim kombinacijama procesnih parametara na osnovi kojih je moguće odrediti optimalne parametre procesa uz ekonomsku i energetska uštedu (Carley i sur., 2004). U ovome radu, planiranje pokusa kao i statistička obrada dobivenih podataka te određivanje optimalnih uvjeta u ispitivanim procesima, provedeni su pomoću programskog paketa Design Expert 9.0.5., a korištena je Box-Behnken metoda odzivnih površina. Svi eksperimentalno određeni i izračunati podaci prema primijenjenom matematičkom modelu prikazani su u tablicama i dijagramima.

Iz eksperimentalnih vrijednosti apsorbancija (**Tablice 7-9**) dobivenih spektrofotometrijskim mjerenjem pomoću regresijskih jednadžbi (**6, 8 i 10**) dobivenih iz kalibracijskih krivulja (**Slike 12-14**) izračunate su masene koncentracije fenolnih spojeva i izražene u ekvivalentima galne kiseline za ukupne fenolne tvari [$\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$], odnosno u ekvivalentima (+)-katehina za ukupne flavonoide po mL ekstrakta [$\text{mg}_{\text{CE}}/\text{mL}$]. Konačni sadržaj fenolnih tvari izražen je kao maseni udio fenolnih tvari prema jednadžbi (**17**), odnosno u ekvivalentima galne kiseline (katehina) po masi suhe tvari uzorka. Suha tvar uzorka tijekom biološke obrade kukuruzne silaže kretala se u rasponu 81,81-98,21% (**Tablica 6**).

Rasponi masenih udjela fenolnih spojeva i flavonoida, dobivenih eksperimentalnim putem, prikazani su u **Tablici 10**. Maseni udio ukupnih fenolnih tvari određenih Folin-Ciocalteuovom metodom u ekstraktima kukuruzne silaže, pri ispitivanim uvjetima, kretao se u rasponu od 2,91 do 9,47 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$, dok je udio ukupnih fenolnih tvari određenih Prussian-Blue metodom bio u rasponu od 0,08 do 0,55 $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$. Vidljivo je da su niže vrijednosti ukupnih fenolnih spojeva dobivene PB metodom što se može objasniti većom specifičnošću za određivanje fenolnih tvari u odnosu na Folin-Ciocalteuovu metodu. Maseni udio ukupnih flavonoida u ekstraktima kukuruzne silaže, pri ispitivanim uvjetima, kretao se u rasponu od 0,31 do 1,47 $\text{mg}_{\text{CE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$.

Nadalje, u ovom radu određeni su maseni udjeli pojedinačnih fenolnih kiselina (*p*-kumarinska: *pCuA*; ferulična kiselina: *FA*; kafeinska kiselina: *CA*) tijekom biološke obrade kukuruzne silaže pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti – HPLC. Za ispitivane pojedinačne fenolne kiseline napravljene su kalibracijske krivulje iz kojih su dobivene regresijske

jednadžbe (**11**, **13** i **15**). Na osnovi jednadžbi **12**, **14** i **16** izračunate su masene koncentracije $p\text{CuA}$, FA i CA. Krajnji rezultat izražen je kao maseni udio (jednadžba **17**) pojedinačnih fenolnih kiselina po masi suhe tvari uzorka [$\text{mg/g}_{\text{s.t.}}$].

Rasponi masenih udjela pojedinačnih fenolnih kiselina prikazan su u **Tablici 11**. Maseni udio p -kumarinske kiseline kretao se u rasponu od 0,08 do 0,36 $\text{mg/g}_{\text{s.t.}}$. Kod ferulične kiseline taj raspon je od 0,01 do 0,27 $\text{mg/g}_{\text{s.t.}}$, dok se maseni udio kafeinske kiseline nalazi u rasponu od 0,02 do 0,14 $\text{mg/g}_{\text{s.t.}}$.

Da bi se ispitao utjecaj nezavisnih varijabli biološke obrade kukuruzne silaže i njihove interakcije (broj plagova, masa kukuruzne silaže, pH i vrijeme fermentacije) na zavisnu varijablu (prinos fenolnih spojeva) te provjerila prikladnost Box-Behnken plana pokusa u modeliranju i optimiranju procesa biološke obrade uzoraka kukuruzne silaže, provedena je aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom, tj. polinomom drugog reda premajednadžbi **4**. Model i njegovi koeficijenti dobiveni su statističkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka, a model daje funkcionalnu ovisnost između zavisne i nezavisnih varijabli. Sastoji se od linearnog i kvadratnog člana te člana koji predstavlja interakciju ispitivanih varijabli.

Najprihvatljiviji model određen je na temelju maksimalne vrijednosti koeficijenta korelacije (R) koji je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka i u idealnom slučaju iznosi 1. Aproksimacijom eksperimentalnih podataka kvadratnim polinomom prema jednadžbi **4** dobivene su jednadžbe kvadratnog polinoma (**18-23**) te su utvrđene srednje jaka korelacija do jaka korelacija ($R = 0,67-0,82$) eksperimentalnih i modelom izračunatih podataka za ukupne fenolne tvari određene po FC i PB metodi kao i za UFL (**Tablice 12-14**) što grafički prikazuju **Slike 15**, **17** i **19**. Za analizirane fenolne kiseline utvrđena je jaka pozitivna korelacija ($R \geq 0,78$) između eksperimentalnih i modelom izračunatih podataka (**Tablice 15-17** i **Slike 21**, **23** i **25**). Prema visokim koeficijentima korelacije generalno se može zaključiti da se proces biološke obrade kukuruzne silaže može opisati kvadratnim polinomom. Međutim, često odabrani model aproksimacije eksperimentalnih podataka ne opisuje u potpunosti ispitivano eksperimentalno područje. Zbog toga je uz koeficijent korelacije, kao pokazatelja uspješnosti aproksimacije, provedena detaljnija statistička analiza (ANOVA) na osnovi koje se može preciznije utvrditi opravdanost primjenjivosti odabranog modela. Kada su vrijednosti „Prob > F “ za određene članove odzivnog polinoma manje od 0,05 (p -vrijednost), onda su ti članovi značajni. To znači da je vrijednost (eng. Probability) dobivanja tako velike F vrijednosti uslijed šuma, manja od 5% (Bezzera i sur., 2008). Isto tako važan je statistički parametar „nedostatak modela“ (eng. lack of fit) za koji je poželjno da bude statistički nesignifikantan kod modela koji je najprikladniji za opisivanje promatranog procesa.

Statističkom analizom (ANOVA) utvrđeno je da je aproksimacija eksperimentalnih vrijednosti masenih udjela ukupnih fenolnih spojeva (**Tablice 12-13**) i masenih udjela flavonoida (**Tablica 14**) u ekstraktima svih ispitivanih uzoraka biološki obrađene kukuruzne silaže, kvadratnim polinomom, statistički neznajna uz statistički značajan „nedostatak modela“ kod ukupnih fenola određenih prema FC metodi. Takva opažanja upućuju na to da navedeni model nije u potpunosti prikladan za opisivanje procesa biološke obrade kukuruzne silaže u provedenim eksperimentalnim uvjetima s ciljem ekstrakcije ukupnih fenolnih spojeva. Međutim, iz navedenih tablica vidljivo je da je broj plagova gljive *T. versicolor* tijekom biološke obrade imao najveći utjecaj na ekstrakciju ukupnih fenolnih tvari određenih FC metodom što se očituje kroz statistički značajan linearni član za plagove (**Tablica 12**). **Slika 16** prikazuje 3D dijagram odzivne površine gdje odzivna površina predstavlja modelom predviđene masene udjele ukupnih fenolnih spojeva za ispitane kombinacije mase kukuruzne silaže i broj plagova *T. versicolor*. Iz dijagrama je vidljivo da porastom broja plagova raste udio fenolnih spojeva (dokaz je statistička značajnost linearnog člana polinoma). Kod ukupnih fenolnih spojeva određenih prema PB metodi (**Tablica 13**) prema statističkoj analizi značajan utjecaj na promatrani proces imali su broj plagova i masa i to kao individualni parametri (njihov linearni i kvadratni član) te u njihovoj kombinaciji (značajnost člana njihove interakcije) što upućuje na to da je taj utjecaj još izraženiji nego kod ukupnih fenolnih tvari određenih FC metodom. Iz 3D dijagrama (**Slika 18**) je vidljivo da je porastom broja plagova i mase kukuruzne silaže prvo padao prinos fenola do neke minimalne vrijednosti a potom ponovo rastao. Kod ukupnih flavonoida statistički značajan utjecaj su imali samo kvadratni članovi za broj plagova i mase kao i kvadratni član za temperaturu (**Tablica 14**). Pripadajući 3D dijagram (**Slika 20**) prikazuje da porastom broja plagova i mase prinos ukupnih flavonoida najprije raste, postiže maksimalnu vrijednost (dokaz je statistička značajnost kvadratnog člana modela) i potom opada.

Slična opažanja su uočena i kod analiziranih fenolnih kiselina gdje su model i nedostatak modela statistički neznajni za *p*-kumarinsku kiselinu (**Tablica 15**) i feruličnu kiselinu (**Tablica 16**) dok su kod kafeinske kiseline oni značajni (**Tablica 17**). Iz navedenog može se zaključiti da je kvadratni polinom u okviru provednog istraživanja najprikladniji za opisivanje procesa biološke obrade kukuruzne silaže s ciljem dobivanja što većeg prinosa kafeinske kiseline. Na ekstrakciju fenolnih kiselina također je najveći utjecaj imao broj plagova *T. versicolor* tijekom biološke razgradnje kukuruzne silaže što potvrđuje njegova statistička analiza. Porastom broja plagova povećavao se maseni udio ekstrahirane *p*-kumarinske kiseline do neke maksimalne vrijednosti (statistička značajnost kvadratnog člana) a potom je opadao (**Slika 22**). Za feruličnu kiselinu (**Slika 24**) je porastom broja plagova tijekom promatranog procesa rastao, i njezin maseni udio u ekstraktima (statistička značajnost linearnog člana). Kod kafeinske kiseline pored broja plagova značajan utjecaj

imali su i masa kao kvadratni član, inetrakcija broja plagova i pH vrijednost te vrijeme kao linerani član i individualni faktor (**Tablica 17**). **Slika 26** prikazuje 3D dijagram ovisnosti masenog udjela ekstrahirane kafeinske kiseline o broju plagova *T. versicolor* i mase silaže tijekom biološke obrade kukuruzne silaže. Vidljivo je da porastom broja plagova i mase, maseni udio kafeinske kiseline najprije raste, postiže maksimalnu vrijednost (dokaz je značajnost kvadratnog člana modela) a potom opada.

Numeričkom optimizacijom pomoću programa Design Expert 9.0.5. a prema jednadžbama (**18-23**) izračunati su optimalni uvjeti biološke obrade kukuruzne silaže, za ispitivano eksperimentalno područje te se može zaključiti da se uvjeti razlikuju za analizirane fenolne spojeve što prikazuje **Tablica 18**. Isto tako izračunato jer da bi se pri procjenjenim uvjetima moglo ekstrahirati UFT_FC: 8,21 mg_{GAE}/g_{s.t.}; UFT_PB: 0,68 mg_{GAE}/g_{s.t.}; UFL: 1,06 mg_{CE}/g_{s.t.}; *p*-CuA: 0,33 mg/g_{s.t.}; FA: 0,22mg/g_{s.t.}; CA: 0,14mg/g_{s.t.}. Najbolje slaganje između prinosa fenolnih spojeva pri procjenjenim optimalnim uvjetima biološke razgradnje i eksperimentalnih podataka uočeno je kod kafeinske kiseline što je bilo za očekivati s obzirom na to da je kvadratni polinom najbolje opisivao proces biološke obrade kukuruzne silaže s ciljem dobivanja što većeg prinosa kafeinske kiseline.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi dobivenih eksperimentalnih podataka, njihove statističke obrade Box-Bhenkenovom metodom odzivnih površina i rasprave za uvjete provedbe eksperimenata zaključeno je slijedeće:

- U ekstraktima biološki obrađene kukuruzne silaže dokazano je od 2,91 do 9,47 mg_{GAE}/g_{s.t.} ukupnih fenolnih tvari prema metodi Folin-Ciocalteu, te od 0,08 do 0,55 mg_{GAE}/g_{s.t.} ukupnih fenolnih tvari prema Prussian-Blue metodi.
- Maseni udio ukupnih flavonoida u ekstraktima kukuruzne silaže, pri ispitivanim uvjetima, kretao se u rasponu od 0,31 do 1,47 mg_{CE}/g_{s.t.}.
- Od ispitivanih parametra biološke obrade kukuruzne silaže, broj plagova gljive *T. versicolor* i masa kukuruzne silaže imali su najizraženiji utjecaj na ekstrakciju analiziranih fenolnih spojeva.
- Ispitivani matematički model (kvadratni polinom) generalno je pokazao dobra slaganja eksperimentalno određenih masenih udjela analiziranih fenolnih tvari sa aproksimiranim vrijednostima fenolnih tvari, te srednje jaku do jaku korelaciju ($R = 0,67-0,82$) za ukupne fenolne tvari određene po FC i PB metodi i ukupne flavonoide. Za analizirane fenolne kiseline utvrđena je jaka pozitivna korelacija ($R \geq 0,78$) između eksperimentalnih i modelom izračunatih podataka.
- Kvadratni polinom u okviru provednog istraživanja pokazao se najprikladniji za opisivanje procesa biološke obrade kukuruzne silaže s ciljem dobivanja što većeg prinosa kafeinske kiseline (dokaz: $R > 0,90$ i statistički neznačajan „*lack of fit*“)
- Optimalni uvjeti biološke obrade kukuruzne silaže za dobivanje maksimalnog prinosa analiziranih tvari u ispitivanim uvjetima su različiti a za kafeinsku kiselinu su to 9 plagova, 40 g kukuruzne silaže, pH 9 i 10 dana fermentacije. Modelom predviđeni maksimalni prinos kafeinske kiseline koji bi se mogao ekstrahirati pri određenim optimalnim uvjetima je 0,14 mg/g_{s.t.} što je u skladu s eksperimentalno određenim prinosom kafeinske kiseline.

7. LITERATURA

- Altman A: *Agricultural biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1998.
- Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyüren M, Esin Çelik S, Bektaşoğlu Berker KI, ÖzyurtD: Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. Review. *Molecules* 12:1496–1547, 2007.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaliera LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965-977, 2008.
- Bravo L: Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Review*. John Wiley & Sons, Inc, New York 56:317–333, 1998.
- Bucić-Kojić A: Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2008.
- Budini R, Tonelli D, Girotti S: Analysis of Total Phenols Using the Prussian Blue Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28:1236–1238, 1980.
- Bezerra M, Santelli R, Oliveira E, Villar L i Escalera L: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965-977, 2008.
- Cao BB, Jin X, Yang HJ, Li HL i Jiang LS: Microbial release of ferulic and *p*-coumaric acids from forages and their digestibility in lactating cows fed total mixed rations with different forage combinations. *Society of Chemical Industry*, 2015.
- Carley KM, Kamneva NY i Reminga J: Response Surface Methodology – CASOS Technical Report. CMU-ISRI-04-136, 2004. <http://reports-archive.adm.cs.cmu.edu/anon/isri2004/CMU-ISRI-04-136.pdf> [08.07.2015.]
- Chafer A, Berna A, Monton JB, Munoz R; High-pressure solubility data of system ethanol (1) + epicatechin (2) + CO₂ (3). *Journal of supercritical Fluids* 24:103–109, 2002.
- Chalermchat Y, Fincan M, Dejmeek P: Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment: mathematical modelling of mass transfer. *Journal of Food Engineering* 64:229–236, 2004.
- Corn Agronomy, 2015.: <http://corn.agronomy.wisc.edu/Silage/> [09.07.2015.]
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Poel BV, Pieters L, Vlietinck AJ, Berghe DV: Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products* 61:71-76, 1988.

- Dai J, Mumper RJ: Plant Phenolics: Extraction, Analysis and their Antioxidant Anticancer Properties. *Molecules* 15:7313-7352, 2010.
- Dent M: Utjecaj postupaka ekstrakcije na sastav i količinu fenolnih spojeva kadulje. *Doktorski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2013.
- Drmić H i Režek Jambrak A: Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 2(2):22-33, 2010.
- Floros JD, Rattray J, Liang H: Mass transfer and diffusion in foods. U *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999.
- Gadd GM: *Fungi in Bioremediation*. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge 2001.
- Han X, Shen T, Luo H: Dietary Polyphenols and Their Biological significance. *Review. International Journal of Molecular Sciences* 8:950-988, 2007.
- Katalinić V, Smole Možina S, Skroza D, Generalić I, Abramović H, Miloš M, Ljubenkov I, Piskernik S, Pezo I, Terpinč P, Boban M: Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry* 119:715-723, 2010.
- Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 55:279-290, 2004.
- Kleinert M i Barth T: Phenols from lignin. *Chemical Engineering and Technology* 31:736-745, 2008.
- Kuzmanović M; Tišma M, Bucić-Kojić A, Casazza AA, Paini M, Aliakbarian B, Perego P: High-Pressure and Temperature Extraction of Phenolic Compounds from Corn Silage. *Chemical Engineering Transactions* 43:2283-9216, 2015.
- Liyana-Pathirana C i Shahidi F: Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93:47-56, 2005.
- Macheix JJ, Fleureit A, Billot J: Fruit Phenolics. *CRC Press, Boca Raton, Florida USA*, 1990.
- Maestri DM, Nepote V, Lamarque AI, Zygodlo JA: Natural products as antioxidants. *Phytochemistry: Advances in Research* 37/661:105-135, 2006.
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M: Total phenolic and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40:255-260, 2005.

- Mussato SI, Ballesteros LF, Martins S, Texeira JA: Use of Agro-Industrial Wastes in Solid State Fermentation Processes. *Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Portugal* 121:140, 2012.
- Nacz M, Shahidi F: Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography* 1054:95-111, 2004.
- Nacz M, Shahidi F: Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:1523-1542, 2006.
- Parr AJ i Bolwell JP: Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:985-1012, 2002.
- Pereira DM, Valentão P, Andrade P: Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules* 14:2202-2211, 2009.
- Planinić M, Bucić-Kojić A, Tomas S, Bilić M, Velić D, Koceva Komlenić D: Fast moisture determination methods in flour samples. U Proceedings of International Congress Flour Bread'03 and 6. Croatian Congress of Cereal Technologists, str. 102-108. Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2004.
- Rodríguez Couto S i Ángeles Sanromán M: Application of solid-state fermentation to food industry. *Journal of food Engineering* 76:291-302, 2006.
- Schroyen M, Vervaeren H, Vandepitte H, Van Hulle SWH, Raes K: Effect of enzymatic pretreatment of various lignocellulosic substrates on production of phenolic compounds and biomethane potential. *Bioresource Technology* 192:696-702, 2015.
- Schuster B, Hermann K: Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid and derivatives in soft fruits. *Phytochemistry* 24 (11):2761-2764, 1985.
- Skoog DA, West DM, Holler JJ: *Osnove analitičke kemije*. Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- Strack D: Phenolic metabolism. U *Plant biochemistry*, (Dey PM, Harborne JB, ured.), str. 387-416. Academic Press, London, UK, 1997.
- Stratil P, Klejdus B, Kubán V: Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:607-616, 2006.
- Thalero K i Thalero A: *Foundations in microbiology*, Wm-C. Brown Publisher, USA, 1996.

- Vranić M, Knežević M, Perčulija G, Grbeša D, Leto J, Bošnjak K, Rupić I : Kvaliteta kukuruzne silaže na obiteljskom poljoprivrednim gospodarstvima. *Mljekarstvo* 54 (3):175-186, 2004.
- Webster J i Weber R: *Introduction to fungus*, Cambridge University Press, Cambridge 2007.
- Weinberg ZG, Khanal P, Yildiz C, Chen Y, Arieli A: Ensiling fermentation products and aerobic stability of corn and sorghum silage. *Grassland Science* 57:46-50, 2011.
- Winkel-Shirley B: Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiology* 126:485-493, 2001.
- Xavier AMRB, Tavers APM, Ferreira R, Amando 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 i Masood A: *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. Wiley, John & Sons, Inc., New York, 1998.