

Mogućnosti iskorištenja otpada iz industrije ulja

Šabić, Irena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:138468>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Irena Šabić

MOGUĆNOSTI ISKORIŠTENJA OTPADA IZ INDUSTRIJE ULJA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Inženjerska termodinamika
Tema rada je prihvaćena na XI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 25. rujna 2017. godine.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Sandra Budžaki*
Pomoć pri izradi: *Goran Miljić*, mag. ing. proc., asistent

Mogućnosti iskorištenja otpada iz industrije ulja

Irena Šabić, 0113130894

Sažetak: Otpad, odnosno nusprodukt koji zaostaje nakon hladnog prešanja uljarica naziva se pogača. Obzirom da sadrže zaostalo ulje, velike količine proteina, prehrambenih vlakana, minerale i druge bioaktivne spojeve, pogače su prepoznate kao vrijedna sirovina u proizvodnji visokovrijednih proizvoda ili kao hranjiv dodatak prehrani. U ovom radu provedena je kemijska analiza pogače buče i lana, prije i nakon biološke obrade u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima s gljivom bijelog truljenja, *Trametes versicolor*, i termofilnom gljivom, *Humicola grisea*. Udjeli suhe tvari, pepela, ukupnih i ekstraktibilnih proteina, masti, vlakana (NDF, ADF, ADL), ekstraktibilnih šećera, te ukupnog organskog ugljika određeni su u neobrađenim pogačama, te nakon 10 dana biološke obrade. Maseni udjeli pojedinačnih šećera su analizirani svakog dana uzgoja. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da se prilikom obrade bučine pogače s *Trametes versicolor* značajno smanjuje udio masti i vlakana, dok prilikom obrade s *Humicola grisea* ne dolazi do tolike promjene u navedenim udjelima, ali se primjećuje porast udjela proteina. Kod obrade pogače lana s oba mikroorganizma, zabilježen je porast udjela proteina i ekstraktibilnih šećera, dok je udio vlakana i masti smanjen. Na temelju analize pojedinačnih šećera ustanovljeno je kako oba mikroorganizma imaju sposobnost razgradnje polisaharida, uz oslobađanje monosaharida i oligosaharida.

Ključne riječi: pogača buče, pogača lana, *Trametes versicolor*, *Humicola grisea*, fermentacija na čvrstim nosačima

Rad sadrži: 59 stranica
15 slika
5 tablica
66 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

1.	izv. prof. dr. sc. <i>Marina Tišma</i>	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. <i>Sandra Budžaki</i>	član-mentor
3.	red. prof. dr. sc. <i>Tihomir Moslavac</i>	član
4.	red. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>	zamjena člana

Datum obrane:

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of thermodynamic and reaction engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program: Food Engineering
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Engineering thermodynamics
Thesis subject: was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XI held on September 25, 2017.
Mentor: Sandra Budžaki, PhD, associate prof.
Technical assistance: Goran Miljić, mag. ing. proc., assistant

Utilization opportunities of waste from the oil industry

Irena Šabić, 0113130894

Summary: The waste, or by-product that remains after the cold pressing of the oilseeds, is called oil cake. Due to the residual oil content, high amount of proteins, dietary fibers, minerals and other bioactive compounds, oil cakes are recognized as a valuable raw material in the production of high-value products, or as a nutritional dietary supplement. In this paper, pumpkin and flaxseed oil cakes were analysed, before and after fermentation with white rot fungus, *Trametes versicolor*, and thermophilic fungus, *Hemicoloma grisea*, using solid state technology. Contents of dry matter, ash, total and extractable proteins, ether extract, fibers (NDF, ADF, ADL), extractable sugars, and total organic carbon were determined in untreated oil cakes and after 10 days of fermentation. Concentration of simple sugars was analyzed every day of cultivation. Based on the obtained results, it was concluded that after processing pumpkin oil cake with *Trametes versicolor*, contents of ether extract and fibers are significantly reduced, while processing with *Hemicoloma grisea* does not have significant impact on those parameters, but causes an increase in protein content. After processing of flaxseed oil cake with either of the two microorganisms, an increase in the protein and extractable sugars content was observed, while contents of fibers and ether extract decreased. Based on the analysis of individual simple sugars, it was found that both microorganisms have the ability to break down polysaccharides, simultaneously releasing monosaccharides and oligosaccharides.

Key words: pumpkin oil cake, flaxseed oil cake, *Trametes versicolor*, *Hemicoloma grisea*, solid state fermentation

Thesis contains: 59 pages
15 figures
5 tables
66 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	Marina Tišma, PhD, associate prof.	chair person
2.	Sandra Budžaki, PhD, associate prof.	supervisor
3.	Tihomir Moslavac, PhD, prof.	member
4.	Ivica Strelec, PhD, prof.	stand-in

Defense date:

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

Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta *Razvoj integriranog mikrosustava za biokatalitičku proizvodnju biodizela* (DeMSy(BioPro)²; IP-2016-06-7993) koji je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Zahvaljujem svima koji su me podržavali na ovome putu.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Vrste otpada iz prehrambene industrije	4
2.1.1. Vrste i karakterizacija otpada nakon proizvodnje hladno prešanog ulja.....	5
2.1.2. Pogača nakon proizvodnje hladno prešanog ulja iz buče.....	6
2.1.3. Pogača nakon proizvodnje hladno prešanog ulja iz lana.....	8
2.2. Uzgoj mikroorganizama na čvrstim nosačima	9
2.2.1. Gljive.....	11
2.2.1.1. <i>Trametes versicolor</i>	12
2.2.2. <i>Humicola grisea</i>	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Zadatak	17
3.2. Materijali	17
3.2.1. Kemikalije	17
3.2.1.1. Priprema otopine fosfatnog pufera	18
3.2.1.2. Priprema Bradford otopine.....	18
3.2.1.3. Priprema neutralne detergent otopine.....	18
3.2.1.4. Priprema kisele detergent otopine	19
3.2.2. Oprema.....	19
3.2.3. Supstrat	20
3.2.4. Mikroorganizmi	20
3.3. Priprema hranjive podloge i uzgoj radnih mikroorganizama	20
3.4. Uzgoj gljiva u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima	20
3.5. Priprema ekstrakata za analize	21
3.5.1. Ekstrakcija topljivih tvari iz pogača uljarica u puferu	21
3.5.2. Kruto-tekuća ekstrakcija.....	22
3.6. Analitičke metode određivanja kemijskog sastava pogača prije i nakon obrade	22
3.6.1. Određivanje vode sušenjem	22
3.6.2. Određivanje udjela mineralnih tvari.....	23
3.6.3. Određivanje udjela proteina.....	24
3.6.3.1. Određivanje proteina po Kjeldahl-u.....	24
3.6.3.2. Određivanje koncentracije ekstraktibilnih proteina Bradford metodom	25
3.6.4. Određivanje masti po Soxhlet-u	26
3.6.5. Određivanje vlakana prema Van Soest-u	26
3.6.5.1. Određivanje neutralnih detergent vlakana (NDF).....	27
3.6.5.2. Određivanje kiselih detergent vlakana (ADF).....	28
3.6.5.3. Određivanje kiselog detergenta lignina (ADL)	29
3.6.6. Određivanje šećera.....	29
3.6.6.1. Određivanje ukupnih ekstraktibilnih šećera fenol-sulfatnom metodom.....	29
3.6.6.2. Određivanje šećera HPLC metodom	30
3.5.8. Analiza ukupnog i anorganskog ugljika na TOC analizatoru	32

3.5.8.1. Određivanje ukupnog ugljika (TC)	32
3.5.8.2. Određivanje anorganskog ugljika (IC)	33
3.5.8.3. Određivanje ukupnog organskog ugljika (TOC)	33
4. REZULTATI I RASPRAVA	35
4.1. Određivanje kemijskog sastava bučine i lanene pogače prije obrade	36
4.2. Biološka obrada bučine pogače	37
4.2.1. Biološka obrada bučine pogače pomoću <i>Trametes versicolor</i> i <i>Humicola grisea</i>	37
4.2.2. Promjena masenog udjela pojedinačnih šećera tijekom biološke obrade bučine pogače s <i>Trametes versicolor</i> i <i>Humicola grisea</i>	38
4.3. Biološka obrada lanene pogače	43
4.3.1. Biološka obrada lanene pogače pomoću <i>Trametes versicolor</i> i <i>Humicola grisea</i>	43
4.3.2. Promjena masenog udjela pojedinačnih šećera tijekom biološke obrade lanene pogače s <i>Trametes versicolor</i> i <i>Humicola grisea</i>	44
5. ZAKLJUČCI	50
6. LITERATURA	53

Popis kratica

ADF	kisela detergent vlakna (eng. <i>acid detergent fiber</i>)
ADL	kiseli detergent lignin (eng. <i>acid detergent lignin</i>)
Hgvt	<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. <i>high performance liquid chromatography</i>)
IC	anorganski ugljik (eng. <i>inorganic carbon</i>)
NDF	neutralna detergent vlakna (eng. <i>neutral detergent fiber</i>)
PAH	policiklički aromatski ugljikovodici (eng. <i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i>)
PB	fosfatni pufer (eng. <i>phosphate buffer</i>)
PCB	poliklorirani bifenili (eng. <i>polychlorinated biphenyls</i>)
PCP	pentaklorfenol (eng. <i>pentachlorophenol</i>)
PDA	krumpirov agar (eng. <i>potato dextrose agar</i>)
PMMA	polimetil metakrilat
SmF	submerzna fermentacija (eng. <i>submerged fermentation</i>)
SSF	fermentacija na čvrstim nosačima (eng. <i>solid state fermentation</i>)
TC	ukupni ugljik (eng. <i>total carbon</i>)
TOC	ukupni organski ugljik (eng. <i>total organic carbon</i>)

1. UVOD

Svaka prehrambena industrija proizvodi veliku količinu otpada. Navedeni otpad se nekada zbrinjavao odlaganjem na deponije ili spaljivanjem, no u današnje se vrijeme proučavaju dostupne opcije kako bi se povećala vrijednost tih materijala. Otpad prerade hrane je izvor vrijednih spojeva poput prehrambenih vlakana, antioksidanasa, polifenola, esencijalnih masnih kiselina, minerala i mnogih drugih biološki aktivnih spojeva, te se kao takav može još koristiti zbog svojih povoljnih tehnoloških, prehrambenih i funkcionalnih svojstava. Budući da ovakva vrsta otpada nastaje u velikim količinama, predstavlja lako dostupnu i jeftinu sirovinu. Najčešće se koristi kao sastojak hrane/stočne hrane, kao supstrat za mikroorganizme pri proizvodnji finih kemikalija, biomolekula i enzima, u proizvodnji komposta, u proizvodnji energije, te ih čini proizvodima s povećanom vrijednosti.

Prerada uljarica rezultira nastajanjem značajnih količina otpada, odnosno nusproizvoda. Uljne pogače koje zaostaju nakon mehaničkog prešanja uljarica, prepoznate su kao zanimljiv nusprodukt pogodan za primjenu u ljudskoj prehrani i/ili stočnoj ishrani, zbog visoke količine proteina, prehrambenih vlakana, zaostalog ulja i drugih bioaktivnih tvari koje imaju pozitivne zdravstvene učinke. Osim primjene u prehrambene svrhe, uljne pogače predstavljaju idealne podloge za različite biotehnološke procese prilikom proizvodnje biološki aktivnih spojeva, gljiva, bioplina ili biogoriva.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kemijski sastav otpada iz industrije ulja, odnosno uljnih pogača buče golice (*Cucurbita pepo* L.) i lana (*Linum usitatissimum* L.), prije i nakon biološke obrade s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima kroz 10 dana, te istražiti mogućnost poboljšanja nutritivnog sastava navedenih pogača i moguću primjenu. Eksperimentalni dio rada proveden je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek, u Laboratoriju za biokemiju i laboratorijima Zavoda za procesno inženjerstvo.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Vrste otpada iz prehrambene industrije

Tijekom cijelog ciklusa proizvodnje hrane, odnosno od poljoprivrede, preko industrijske proizvodnje i prerade, pa sve do maloprodaje i potrošnje u kućanstvima dolazi do stvaranja velikih količina otpada i nusproizvoda (Mirabella i sur., 2014.). Sav otpad nastao u prehrambenoj industriji može biti podijeljen u dvije glavne grupe, na otpad biljnog i otpad životinjskog podrijetla, sa podgrupama kao što su žitarice, gomolji, voće i povrće, mesni proizvodi i mliječni proizvodi (Tamer i Çopur, 2014.).

Nakupljanje otpada i nusproizvoda biljnog podrijetla uzrokuje zagađenje okoliša, a zbrinjavanje istoga je sve skuplje, te je u novije doba prepoznata važnost iskorištavanja bioloških materijala kao obnovljivih izvora energije (Gadd, 2001.). Upotreba nusproizvoda jedne industrije kao sirovine za drugu industriju nazvana je „čistom tehnologijom“ (Salihu i sur., 2012.). Ovakva upotreba navedenih materijala temelji se na fermentativnim i nefermentativnim postupcima dobivanja željenog produkta. Kada se radi o fermentativnim postupcima, otpad se koristi kao supstrat za mikroorganizme u svrhu proizvodnje niza proizvoda povećane vrijednosti. S druge strane, kod nefermentativnih postupaka, otpad je izvor biološki aktivnih tvari koje je potrebno izdvojiti (Tamer i Çopur, 2014.).

Otpad prehrambene industrije je obećavajući izvor vrijednih spojeva kao što su prehrambena vlakna i brojne biološki aktivne tvari koje uključuju antioksidanse, esencijalne masne kiseline, minerale, itd. Primjerice, komina grožđa je bogat izvor prehrambenih vlakana i polifenola (katehin, epikatehin), sjeme rajčice sadrži znatne količine probavljivih aminokiselina (metionin, cistein, lizin). Nusproizvodi limuna se mogu koristiti kao funkcionalni sastojci pri proizvodnji zdrave hrane, posebice dijetalna vlakna, askorbinska kiselina i flavonoidi (Yağci i Göğüş, 2009.). Osim toga, biljni otpad može biti sirovina za proizvodnju hrane, etanola, biljnih gnojiva, kemikalija, stočne hrane, enzima, gljiva i komposta biokonverzijom u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima pomoću gljiva (Gadd, 2001.; De Paula i sur., 2003.; Tišma i sur., 2019.).

Velika količina biljnog otpada prehrambene industrije se uglavnom sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina, te se nazivaju lignoceluloznim materijalima. Kako su ovi materijali iznimno dostupni, nije iznenađujuće što imaju velik potencijal kao sirovina. Lignocelulozna

biomasa obuhvaća materijale kao što su slama, komina, pulpa voća, mahunarke, žitarice, šećerna trska, uljne pogače i mnogi drugi (Isroi i sur., 2011.; Mussatto i sur., 2012.).

2.1.1. Vrste i karakterizacija otpada nakon proizvodnje hladno prešanog ulja

Nakon prerade uljarica, bilo da se postupak provodi metodom ekstrakcije organskim otapalom ili metodom prešanja pomoću mehaničke preše, zaostaje značajna količina materijala koji obuhvaća ljuske, sjemenke, sačmu, odmašćene pogače i uljni mulj, a ti materijali se smatraju otpadom (Pojić i sur., 2014.). Ovisno o sirovini i željenoj kvaliteti proizvoda, primjenjuje se jedna od metoda ekstrakcije. Kada se u ulju žele zadržati bioaktivni spojevi poput esencijalnih masnih kiselina, fenola, flavonoida i tokoferola, primjenjuje se metoda hladnog prešanja pomoću vijčane ili hidraulične preše. Tada se hladno prešanje koristi za ekstrakciju ulja iz uljarica umjesto uobičajene metode ekstrakcije otapalom (Teh i Birch, 2013.).

Otpad, odnosno nusproizvod koji zaostaje nakon hladnog prešanja uljarica naziva se pogača (**Slika 1**). Uljne pogače se dijele u dvije skupine, jestive i nejestive. Nejestive pogače kao što su pogača ricinusa, karanja pogača i nim pogača se koriste kao organska gnojiva, zbog visokog udjela dušika, fosfora i kalija. S druge strane, jestive pogače imaju visoku nutritivnu vrijednost, osobito ako je njihov sadržaj proteina u rasponu od 15 % do 50 %. Na kemijski sastav pogače utječe sorta uljarice, metoda ekstrakcije i uvjeti uzgoja (Cozea i sur., 2016.; Ramachandran i sur., 2007.).



Slika 1 Pogača buče (Krimer Malešević, 2016.)

Obzirom da sadrže velike količine proteina, prehrambenih vlakana, zaostalo ulje, minerale i druge bioaktivne spojeve, a nemaju štetna organska otapala u sastavu, ove pogače su prepoznate kao dobar izvor novih, hranjivih prehrambenih proizvoda, dodataka prehrani, te proizvoda sa povećanom vrijednošću (Pojić i sur., 2014.; Tamer i Çopur, 2014.). Iako se pojedine pogače primjenjuju kao dodatak ljudskoj prehrani, one se ipak uglavnom prerađuju u stočnu hranu (hranu za perad, preživače, ribe i svinje). Biotehnološka primjena uljnih pogača obuhvaća fermentativnu proizvodnju antibiotika, gljiva, te proizvodnju vitamina, biopesticida, antioksidanasa i drugih (Ramachandran i sur., 2007.). Zahvaljujući preostalom sadržaju ulja i hranjivih tvari koje mogu služiti kao izvor ugljika i dušika, uljne pogače su najčešće korišteni supstrati prilikom proizvodnje lipaze (Salihu i sur., 2012.) i drugih industrijskih enzima poput proteaze, α -amilaze, glukoamilaze, fitaze, itd. Najčešću biotehnološku primjenu imaju pogače suncokreta, lana, sezama, soje, konoplje, kokosa, uljane repice i buče (Ramachandran i sur., 2007.).

2.1.2. Pogača nakon proizvodnje hladno prešanog ulja iz buče

Cucurbita pepo L., odnosno uljna tikva ili buča pripada tradicionalnim uljaricama koja se uzgaja prvenstveno zbog proizvodnje ulja, iako se i meso ploda koristi za prehranu ljudi i životinja. Sjemenke buče su eliptične i blago spljoštene, te mogu imati žuto-bijelu ljusku ili samo tanku tamno zelenu opnu umjesto ljuske, kao što je slučaj kod buče golice. Golica je poznata i pod nazivom „Štajerska uljna buča“, te je preferirana sorta buče pri proizvodnji

ulja, budući da nije potrebno ukloniti ljusku i sve komponente pogače su jestive (Radočaj i sur., 2012.; Krimer Malešević, 2016.). Sjemenke buče pružaju mnoge zdravstvene beneficije zahvaljujući njihovim sastojcima, pa tako imaju pozitivne učinke kod liječenja dijabetesa, hipertenzije, tumora, hiperkolesterolemije, te posjeduju antibakterijske i protuupalne učinke (Radočaj i sur., 2012.). Ovisno o sorti sadrže od 28 % do 32 % proteina i 30-50 % ulja bogatog karotenoidima i tokoferolom (Bochkarev i sur., 2016.; Zdunczyk i sur., 1999.). Hladno prešano bučino ulje je poznato po svojoj specifičnoj, orašastoj aromi, te se već desetljećima koristi kao ulje za salate u brojnim europskim zemljama (Radočaj i sur., 2012.). Kao i sjemenke, povezano je s mnogim zdravstvenim beneficijama poput prevencije raka prostate, ublažavanje dijabetesa, hiperkolesterolemije, artritisa, inkontinencije, itd. (Akin i sur., 2018.).

Bučina pogača se uglavnom koristi kao stočna hrana, no u posljednje vrijeme ima sve veću primjenu u prehrambenoj industriji. U pogači zaostaje oko 30 % ulja koje je bogato omega-6 masnim kiselinama, γ -tokoferolima, mineralima i proteinima, i kao takva ima razne primjene u razvoju funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Radočaj i sur., 2012.). Zbog svog sastava (**Tablica 1**) i funkcionalnih osobina ima primjenu u konditorskoj, mliječnoj industriji (Vukša i sur., 2003.), služi kao dobar supstrat za proizvodnju enzima i drugih produkata u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (Peričin i sur., 2008.), te se zbog visokog sadržaja proteina koristi i kao brašno za ljudsku prehranu (Krimer Malešević, 2016.).

Tablica 1 Kemijski sastav bučine pogače – literaturne vrijednosti

Parametar	Zdunczyk i sur., 1999.	Peričin i sur., 2008.	Radočaj i sur., 2012.	Cozea i sur., 2016.	Bochkarev i sur., 2016.	Krimer Malešević, 2016.
Suha tvar (%)	93,01	-	96,50	-	91,80-94,50	93,27
Pepeo (% s.t.)	9,09	-	6,50	-	8,10-8,70	8,50
Proteini (% s.t.)	59,80	63,52	50,20	29,39	45,60-52,30	51,28
Sirova vlakna (% s.t.)	3,17	4,50	-	-	2,20-4,80**	6,00**
NDF (% s.t.)	10,51	-	-	-	-	-
Ukupni ugljikohidrati (% s.t.)	-	1,10*	4,90	15,88	-	-
Masti i ulja (% s.t.)	-	8,66	31,30	5,92	11,70-19,40	18,66
Minerali	Ca, Mg, Na, K, Mn, Fe, Zn, Cu, P					
Vitamini	B kompleks, E					

* topivi šećeri

** celuloza

2.1.3. Pogača nakon proizvodnje hladno prešanog ulja iz lana

Linum usitatissimum L., odnosno lan, jedna je od najvažnijih uljarica za industrijske i prehrambene svrhe, te kao hrana za životinje i izvor vlakana. Laneno sjeme je plosnato i ovalno sa šiljatim vrhom, žute do tamne boje. Postoje dvije glavne sorte lana, i to predivi lan koji ima primjenu u tekstilnoj industriji, te uljani lan koji se uzgaja za ljudsku i životinjsku potrošnju (Singh i sur., 2011.). Sjeme lana je bogato trima komponentama koje ga čine izrazito korisnim u prehrani, a to su α -linolenska kiselina (omega-3 masna kiselina, esencijalna za ljude), visok udio prehrambenih vlakana (topljivih i netopljivih) i lignan. Također je izvor visokokvalitetnih proteina, fenolnih spojeva, omega-6 masnih kiselina, fitokemikalija i fitoestrogenskih spojeva (Banerjee i Thiagarajan, 2015.; Singh i sur., 2011.), te sadrži 30-40 % ulja. Osim što se pojavljuje kao važan sastojak funkcionalne hrane i pokazuje pozitivne učinke na prevenciju bolesti (Gutiérrez i sur., 2010.), hladnim prešanjem daje ulje bogato α -linolenskom kiselinom (do 57 % u ulju) (Bochkarev i sur., 2016.). Ulje lana se od davnina koristi u proizvodnji boja, lakova, linoleuma, voštanog platna, tiskarske boje, sapuna, bioinsekticida i herbicida (Banerjee i Thiagarajan, 2015.; Singh i sur., 2011.).

Lanena pogača je zanemaren nusproizvod koji se u većoj mjeri koristi kao stočna hrana, i to nakon odmaščivanja, za tovne životinje i mliječna goveda, pa tako kao dodatak prehrani ima blago laksativni učinak, te stimulira apetit (Singh i sur., 2011.). Njen sastav (**Tablica 2**) ju čini pogodnom i za primjenu u ljudskoj prehrani, najčešće u mljevenom obliku i to kao žitarice za doručak, energetske pločice, palačinke i vafle, te razne pekarske proizvode (Ogunronbi i sur., 2011.). Kao sjeme, i pogača je bogata hranjivim tvarima poput proteina, lipida, vlakana, lignana, omega-3 masnih kiselina, te stoga još uvijek imaju ogroman iskoristivi potencijal kao izvor ovih sastojaka (Gutiérrez i sur., 2010.).

Tablica 2 Kemijski sastav pogače lana – literaturne vrijednosti

Parametar	Gutiérrez i sur., 2010.	Bochkarev i sur., 2016.	Cozea i sur., 2016.	Halle i Schöne, 2013.	Ogunronbi i sur., 2011.	Krimer Malešević, 2016.
Suha tvar (%)	89,35	91,40-93,10	-	89,70	89,60-91,20	91,30
Pepeo (% s.t.)	3,40	4,80-5,00	-	5,20	3,90-5,40	5,19
Proteini (% s.t.)	27,78*	32,60-38,10	14,40	32,20	29,80-35,40	35,26
Sirova vlakna (% s.t.)	7,02	5,70-7,40**	-	-	53,10-56,30	9,38**
NDF (% s.t.)	-	-	-	19,40	-	-
ADF (% s.t.)	-	-	-	13,00	-	-
Lignin (% s.t.)	-	-	-	5,00	-	-
Ukupni ugljikohidrati (% s.t.)	-	-	16,26	-	-	-
Masti i ulja (% s.t.)	29,37	10,90-19,00	6,83	13,00	12,40-22,50	6,60
Minerali	Ca, Mg, P, K, Fe					
Vitamini	B kompleks, E					

* N x 6.25

** celuloza

2.2. Uzgoj mikroorganizama na čvrstim nosačima

Fermentacija je aerobni ili anaerobni proces u kojem mikroorganizmi iskorištavaju hranjive tvari uz istovremenu proizvodnju metabolita i akumulaciju biomase (Chen, 2013.). Procesi fermentacije općenito su podijeljeni na submerzne fermentacije u tekućoj podlozi (SmF) i na fermentacije na čvrstoj podlozi odnosno nosačima (SSF). Glavna razlika između njih je u udjelu prisutne vode u supstratu. U slučaju SmF-a udio čvrste tvari rijetko kada prelazi koncentraciju od 50 g/L, dakle sadržaj vode je najmanje 95 % (Mitchell i sur., 2000.), dok kod SSF-a udio vode u supstratu varira između 40 i 80 % (Ali i Zulkali, 2011.).

Dakle, uzgoj ili fermentacija na čvrstim nosačima (SSF) podrazumijeva rast radnih mikroorganizama na ili blizu površine vlažnih, čvrstih čestica supstrata, gdje je glavnina vode koja je potrebna za rast i metabolizam apsorbirana ili vezana za supstrat. Međuprostor je uglavnom ispunjen plinovitom fazom, odnosno zrakom, no moguća je prisutnost minimalnih količina slobodne vode koja se pojavljuje u obliku kapljica ili tankog filma na površini čestica supstrata (Mitchell i sur., 2006.; Pandey, 2003.).

Iako neke grupe mikroorganizama, kao što su bakterije i kvasci, rastu u tekućini, veliki broj ostalih mikroorganizama raste pričvršćen za čvrste supstrate ili unutar njih, što posebice vrijedi za gljive. SSF procesi imitiraju uvijete u kojima većina mikroorganizama raste u prirodi, te se stoga smatraju boljim izborom od submerznog uzgoja (Hesseltine, 1987.). Osim toga, u odnosu na SmF, uzgojem na čvrstim nosačima postiže se i veći prinos produkta, nastaje manje otpadnih voda, utrošak energije prilikom procesa je manji, a tehnologija je jednostavnija, kao i procesi izdvajanja i pročišćavanja produkata. Heterogenost supstrata kod SSF procesa može uzrokovati neujednačeno provođenje procesa, dolazi do samozagrijavanja mase, te je otežano praćenje parametara (pH, temperatura, vlaga, sadržaj hranjivih tvari, itd.), a sam produkt sadrži više nečistoća od produkta nastalog u SmF procesu (Couto i Sanromán, 2006.; Pandey, 2003.).

SSF procesi su u nekim slučajevima ekonomski povoljniji od SmF procesa ukoliko se kao supstrati koriste nusproizvodi ili otpad poljoprivredne i prehrambene industrije, što je ujedno i ekološki prihvatljivije rješenje od odlaganja tog čvrstog materijala (Ali i Zulkali, 2011.; Singhanian i sur., 2009.). U tu svrhu najčešće se koriste slama, piljevina, pšenične i rižine mekinje, repini rezanci, otpad šećerne trske, komina jabuke ili grožđa, ljuske kave, soja, kukuruzno brašno, krumpir, otpad čaja, uljne pogače, te mnogi drugi (Bhargav i sur., 2008.; Pandey i sur., 2000.; Mitchell i sur., 2006.). Navedeni supstrati pripadaju u skupinu neinertnih hranjivih nosača, kada nosače dijelimo prema njihovoj biorazgradivosti. Takva vrsta nosača ne služi samo kao strukturna potpora za rast mikroorganizama već i kao izvor ugljika, dušika te ostalih faktora rasta. Drugu skupinu čine inertni nosači, odnosno teško razgradivi, kemijski inertni, porozni materijali kao što su poliuretanska pjena, makroporozna smola, perlit i vermikulit. Hranjive tvari, koje mikroorganizmi ne mogu priskrbiti iz ovakvih nosača, se dovode u sklopu tekućeg medija raspršenog u porama nosača (Chen, 2013.; Pandey, 2003.).

Od parametara koji utječu na izbor supstrata najvažniji su udio vode, sastav hranjivih tvari u supstratu, veličina čestica, te međuprostor čestica (Bhargav i sur., 2008.). Veličina čestica vlažnog supstrata je najkritičniji parametar za rast i aktivnost mikroorganizama. Općenito, manje čestice osiguravaju veću površinu dostupnu mikroorganizmima, no premale čestice mogu uzrokovati aglomeraciju supstrata i rezultirati manjom aktivnošću mikroorganizama. Nasuprot tome, velike čestice osiguravaju bolju aeraciju supstrata (zahvaljujući većem

međuprostoru čestica), ali i manju slobodnu površinu za mikrobnog djelovanje. Potrebno je dakle odabrati optimalnu veličinu čestica koja će predstavljati kompromis između dostupnosti hranjivih tvari i dostupnosti kisika za svaki individualni proces (Couto i Sanromán, 2006.; Pandey i sur., 1999.; Mitchell i sur., 2002.).

Kao što je prethodno navedeno, uvjeti u SSF procesima nisu optimalni za rast svih mikroorganizama, te su radni mikroorganizmi u većini slučajeva filamentozne gljive koje uspješno rastu u sustavima s malim sadržajem vode. Njihov hifalni način rasta omogućava brzo koloniziranje cijele površine krutine i prodiranje u čestice supstrata ili prijelaz preko područja koja su siromašna nutrijentima u potrazi za istima. Filamentozne gljive također proizvode niz hidrolitičkih enzima kako bi razgradile makromolekule čvrstog supstrata u jednostavnije spojeve. SSF procesi mogu uključivati čiste kulture mikroorganizama ili kombinacije raznih kultura inokuliranih istovremeno ili uzastopno (Mitchell i sur., 2000.; 2002.; 2006.; Rahardjo, 2005.).

SSF je prisutan tisućama godina u proizvodnji tradicionalne hrane poput sira, kruha, soja umaka, fermentiranog sirka i drugih (Rahardjo, 2005.; Bellon-Maurel i sur., 2003.). U novije doba primjenjuje se u proizvodnji aroma, pigmentata, enzima, organskih kiselina, etanola, antibiotika, biopesticida, ali i komposta, proteinima obogaćene stočne hrane, goriva, itd. (Mitchell i sur., 2000.; Thomas i sur., 2013.). Osim toga sve je češća primjena SSF-a u bioprocima poput biorazgradnje čvrstog otpada, bioremedijacije organskih polutanata u tlu, biofiltracije atmosfere (Bellon-Maurel i sur., 2003.), te biotransformacije ostataka usjeva za poboljšanje nutritivne vrijednosti (Singhania i sur., 2009.).

2.2.1. Gljive

Gljive su raznolika skupina eukariotskih organizama koji mogu rasti na raznim supstratima, u gotovo svim uvjetima, te su stoga sveprisutne u okolišu. Imaju važnu ulogu u svim ekosustavima, a posebice u ekosustavu tla, kada je riječ o razgradnji organskih tvari. Ovisno o temperaturnim rasponima na kojima gljive mogu rasti, one su podijeljene na psihrofilne, mezofilne i termofilne gljive. Psihrofilne gljive su sposobne za rast blizu ili ispod 0 °C, a pojedine mogu preživjeti čak i pri vrlo niskoj temperaturi od -40 °C. Dok termofilne gljive mogu rasti i na temperaturama iznad 40 °C, većina gljiva ipak pripada mezofilnim gljivama

koje rastu pri temperaturnom rasponu od 5 do 35 °C, a optimalne temperature rasta su između 25 i 35 °C.

Ovim organizmima pripadaju plijesni, kvasci i filamentozne gljive (Singh, 2006.; Gadd i sur., 2007.). Filamentozne gljive su najvažniji mikroorganizmi za obradu čvrstih supstrata, što se može pripisati hifalnom načinu rasta, te sposobnosti lučenja izvanstaničnih enzima. Imaju razne industrijske primjene, poput primjene u bioremedijaciji (Singh, 2006.; Webster i Weber, 2007.), te u proizvodnji primarnih i sekundarnih metabolita, antibiotika, enzima, vitamina, polisaharida, organskih kiselina, hormona i mnogih drugih komercijalno važnih spojeva (Borràs i sur., 2008.; Vassilev i Vassileva, 1992.). Filamentozne gljive imaju čestu primjenu i u biotransformaciji raznih materijala i otpadnih voda, te se takav proces naziva mikotransformacija (Singh, 2006.).

Sve gljive se prema morfologiji hifa, načinu razmnožavanja i vrsti spora svrstavaju u jednu od 5 skupina: *Deuteromycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* i *Oomycetes* (Webster i Weber, 2007.).

2.2.1. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor je gljiva bijelog truljenja, te pripada skupini *Basidiomycetes* (Xavier i sur., 2007.). Također je poznata i kao *Coriolus versicolor*, *Agaricus versicolor*, *Boletus versicolor*, *Polyporus versicolor*, *Polystictus versicolor*, *Poria versicolor*, te pod kineskim nazivom *Yun-Zhi* i japanskim nazivom *Kawaratake* (Cui i Chisti, 2003.). Obligatni je aerob, te ju je moguće pronaći na mrtvim drvenim trupcima, panjevima, deblima i granama u šumama sjeverne hemisfere. Zbog lepezastog oblika klobuka sa valovitim rubovima i koncentrično obojenim zonama (bijela, boja kože, žuta, smeđa, crvenkasto smeđa, plava i crna) *Trametes versicolor* (Slika 2) je poznat i pod nazivom „puranov rep“ (Cui i Chisti, 2003.; Trudell i Ammirati, 2009.). Pripada mezofilnim gljivama, te mu je optimalna temperatura za rast između 25 i 30 °C, a iznad 37 °C ne raste (Magan, 2008.).



Slika 2 *Trametes versicolor* (Webster i Weber, 2007.)

Gljive bijelog truljenja su među najučinkovitijim razgrađivačima lignoceluloznih materijala, sposobne za depolimerizaciju celuloze, hemiceluloze i lignina, te degradaciju širokog raspona polutanata poput policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH), smjesa polikloriranih bifenila (PCB), pesticida, pentaklorfenola (PCP) i niza sintetičkih boja (Xavier i sur., 2007.; Aust, 1995.). U tu svrhu luče niz nespecifičnih izvanstaničnih enzima (Mahajan, 2011.). Proizvode lignolitičke enzime (lignin peroksidaza, mangan peroksidaza i lakaza) pomoću kojih učinkovito mineraliziraju lignin i ugljikohidrate lignoceluloznih materijala do CO_2 i H_2O . Gljive bijelog truljenja desetljećima se koriste za biološki predtretman, odnosno biokonverziju lignoceluloznih materijala u svrhu dobivanja hranjive i probavljive stočne hrane (Isroi i sur., 2011.; Singh, 2006.).

Kod bijelog truljenja razlikuju se dva općenita uzorka. Istovremeno truljenje obilježava istodobna razgradnja celuloze, hemiceluloze i lignina, a za selektivno bijelo truljenje karakteristična je birana razgradnja lignina i hemiceluloze, dok celuloza uglavnom ostaje nerazgrađena. *Trametes versicolor* pripada grupi gljiva koje provode istovremeno bijelo truljenje (Mahajan, 2011.; Sigoillot i sur., 2012.).

Zbog svog profila oksidativnih izvanstaničnih enzima *Trametes versicolor* se industrijski upotrebljava u procesima bioremedijacije, biorazgradnje, proizvodnji papira i pulpe,

biotransformaciji poljoprivrednih i prehrambenih nusproizvoda (Blanchette, 1991.; Webster i Weber, 2007.). Ova gljiva ima povijest medicinske upotrebe u Azijskoj kulturi, a u novije je vrijeme i predmetom istraživanja u zapadnoj medicini, poput primjene u liječenju karcinoma (Trudell, 2009.; Webster i Weber, 2007.).

2.2.2. *Humicola grisea*

Humicola grisea var. *thermoidea* (*Hgvt*) je termofilna gljiva koja pripada skupini *Deuteromycetes* (Poças-Fonseca i sur., 1997.), a također je poznata i kao *Torula thermophila*, *Humicola insolens*, *Scytalidium thermophilum* (Maheshwari i sur., 2000.; Straatsma i Samson, 1993.).

Općenito, termofilne gljive rastu na temperaturama između 20 °C i 50 °C, vrlo su rasprostranjene na kopnenim staništima, te su glavni sastojci mikroflore koja se razvija u većim masama biljnog materijala, poljoprivrednih i šumskih proizvoda i drugim nakupinama organskog materijala gdje toplina, vlaga i aerobna okolina osiguravaju osnovne uvjete za njihov razvoj (Maheshwari i sur., 2000.). Termofilne gljive imaju jednostavne potrebe za hranjivim tvarima i često ih karakterizira brza stopa rasta i brza razgradnja supstrata (Gadd, 2001.), te daju prinose usporedive s onima kod mezofilnih gljiva čak i kada su uzgajane na manjim količinama hranjivih tvari. Poznate su po svojoj sposobnosti razgradnje biljnih polimera i po svom potencijalu za kompostiranje, te se često koriste u biokonverziji poljoprivrednih ostataka (Singh, 2006.). Zbog njihove uloge u razgradnji biljnih materijala, termofilne gljive su od posebnog znanstvenog i komercijalnog interesa, budući proizvode niz termostabilnih izvanstaničnih enzima (Allison i sur., 1992.; Maheshwari i sur., 2000.).

Optimalna temperatura za rast *Hgvt* je na 40 °C, a maksimalna temperatura rasta joj je na 58 °C (Maheshwari i sur., 2000.). Zahvaljujući visokoj temperaturi uzgoja, mogućnost kontaminacije tijekom uzgoja je minimalna (Gadd, 2001.). *Hgvt* proizvodi nekoliko izvanstaničnih enzima kao što su amilaza, celulaza, trehalaza, ksilanaza, glukoamilaza, te β -glukozidaza (Tosi i sur., 1993.; Campos i Felix, 1995.). Zahvaljujući vrlo učinkovitom sustavu hidrolitičkih enzima ova gljiva može rasti na lignoceluloznim materijalima, te provoditi njihovu biokonverziju u sastojke hrane za životinje i biljna gnojiva (De Paula i sur., 2003.; Poças-Fonseca i sur., 2000.). Osim upotrebe u biokonverziji, *Hgvt* je od velike industrijske važnosti kada je riječ o proizvodnji industrijskih enzima, te upotrebi istih pri proizvodnji

alternativnih goriva i bioetanola iz lignocelulozne biomase (Mello-de-Sousa i sur., 2011.; Poças-Fonseca i sur., 2013.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Cilj ovog rada bio je analizirati kemijski sastav otpada iz industrije ulja nakon hladnog tiješnjenja, prije i nakon biološke obrade s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, te na temelju rezultata kemijskog sastava istražiti u koje svrhe bi se pogače buče i lana mogle iskoristiti.

3.2. Materijali

3.2.1. Kemikalije

Za analizu kemijskog sastava u radu su korištene sljedeće kemikalije:

- ~ 2-etoksietanol, $C_4H_{10}O_2$ (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Njemačka)
- ~ aceton, C_3H_6O (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- ~ acetonitril, C_2H_3N (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Njemačka)
- ~ bakar (II) sulfat pentahidrat, $CuSO_4 \times 5 H_2O$ (ALKALOID AD, Skopje, Makedonija)
- ~ Bradford reagens (BioRad, Njemačka)
- ~ cetiltrimetilamonij bromid, $C_{19}H_{42}BrN$ (ACROS ORGANICS, New Jersey, USA)
- ~ dinatrijev fosfat, Na_2HPO_4 (ACROS ORGANICS, New Jersey, USA)
- ~ fenol, C_6H_5OH (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- ~ fosforna kiselina, H_3PO_4 (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- ~ kalijev hidrogenfosfat, K_2HPO_4 (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- ~ kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ~ klorovodična kiselina, HCl (CARLO ERBA Reagents, Rodano, Italija)
- ~ krumpirov agar; potato dextrose agar, PDA (BIOLIFE, Milano, Italija)
- ~ natrijev sulfat, Na_2SO_4 (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- ~ natrijev hidroksid, NaOH (KEFO, Ljubljana, Slovenija)
- ~ natrij borat dekahidrat, $Na_2B_4O_7 \times 10 H_2O$ (ACROS ORGANICS, New Jersey, USA)
- ~ natrijev etilendiamintetraacetat, EDTA (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- ~ natrijev lauril sulfat, $C_{12}H_{25}NaO_4S$ (ACROS ORGANICS, New Jersey, USA)
- ~ natrijev sulfit, Na_2SO_3 (ACROS ORGANICS, New Jersey, USA)
- ~ n-oktanol, $C_8H_{18}O$ (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Njemačka)

- ~ petroleter, C₄H₁₀O (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- ~ sumporna kiselina, H₂SO₄ (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

3.2.1.1. Priprema otopine fosfatnog pufera

Za pripremu otopine fosfatnog pufera prvotno su pripravljene otopine kalijevog dihidrogenfosfata (KH₂PO₄) i kalijevog hidrogenfosfata (K₂HPO₄). Izvagano je 136,09 g soli KH₂PO₄, otopljeno u destiliranoj vodi, te preneseno u odmjernu tikvicu i nadopunjeno do oznake destiliranom vodom. Dobivena je 1 L otopine, koncentracije 1 mol/dm³. Isti postupak je ponovljen sa soli K₂HPO₄, koje je odvagano 174,18 g, te je također dobivena 1 L otopine koncentracije 1 mol/dm³. Miješanjem 160 mL otopine KH₂PO₄ i 840 mL K₂HPO₄ pripravljena je 1 L 1 M fosfatnog pufera (PB).

0,1 M fosfatni pufer dobiven je miješanjem 100 mL 1 M fosfatnog pufera i 900 mL destilirane vode. pH je podešen na 7,0 dodatkom nekoliko kapi nerazrijeđene fosforne kiseline. Otopine su čuvane u hladnjaku na +4 °C.

3.2.1.2. Priprema Bradford otopine

Za pripremu 100 mL Bradford otopine pomiješan je Bradford reagens sa destiliranom vodom u omjeru 1:4, odnosno 20 mL Bradford reagens sa 80 mL destilirane vode.

3.2.1.3. Priprema neutralne detergent otopine

U veliku čašu stavljeno je oko 600 mL destilirane vode u kojoj su uz zagrijavanje potom postupno otapane kemikalije izvagane na lađicama. Prvo je otopljen natrij borat dekahidrat, zatim natrijev etilendiamintetraacetat (EDTA), te natrijev lauril sulfat. Nakon što su prethodne kemikalije otopljene dodan je i 2-etoksietanol. U drugu manju čašu dodano je oko 50 mL destilirane vode u kojoj je uz zagrijavanje otopljen dinatrijev fosfat. Kada su sve kemikalije otopljene prebačene su u odmjernu tikvicu od 1 L, koja je zatim nadopunjena do oznake destiliranom vodom. Otopini je na kraju provjeren pH koji je trebao biti između 6,9 i 7,1.

3.2.1.4. Priprema kisele detergent otopine

Izvagano je 20 g cetiltrimetilamonij bromida u čašu i polako otapano u destiliranoj vodi, te potom kvantitativno preneseno u odmjernu tikvicu od 1 L. U odmjernu tikvicu je dodana destilirana voda do 2/3 volumena, a zatim i 26 mL 1 M sumporne kiseline, te je nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Otopina je potom čuvana u označenoj boci.

3.2.2. Oprema

Za provedbu analiza je korištena sljedeća aparatura:

- ~ Analitička vaga (CRYSTAL 200 CE)
- ~ Analizator ugljika TOC (Shimadzu TOC-L_{CPH/CPN}, SSM-5000A)
- ~ Analizator vlage (Mettler Toledo HR 73)
- ~ Autoklav (TIP 7510945)
- ~ Centrifuga (HERMLE Z 326 K)
- ~ Inkubator (BINDER GmbH, KB 115)
- ~ Kjeldahl digestiona jedinica – blok za razaranje (Behr Labor-Technik, Behrotest K12)
- ~ Mufolna peć (Nabertherm LE 14/11/R7)
- ~ pH metar (Hanna Instruments 2211 pH/ORP Meter)
- ~ Spektrofotometar (ThermoSpectronic, Helios γ)
- ~ Sušionik (Memmert UFE 500)
- ~ Tehnička vaga (OHAUS)
- ~ Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti UHPLC (Shimadzu Nexera XR)
- ~ Ultracentrifugalni mlin (Retsch ZM200)
- ~ Ultrazvučna kupelj (Elma, Elmasonic P 120 H)
- ~ Uređaj za destilaciju vodenom parom (Gerhard, Vapodest 1)
- ~ Uređaj za određivanje sirovih vlakana (Velp Scientifica, FIWE 3)
- ~ Vibrirajuća miješalica (TEHTNICA Vibromix 10)
- ~ Vodena kupelj s trešnjom (Julabo SW 23)

3.2.3. Supstrat

Kao neinertni čvrsti nosači korištene su pogače buče i lana s „Obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva Lazić“ (Vraneševci, Hrvatska), nusproizvodi nastali u proizvodnji hladno prešanih ulja.

3.2.4. Mikroorganizmi

Kao radni mikroorganizmi za biološku obradu pogača buče i lana korištene su gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV6 (National Institute of Chemistry – MZKI, Ljubljana, Slovenija) i termofilna gljiva *Humicola grisea* (Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, Hrvatska).

3.3. Priprema hranjive podloge i uzgoj radnih mikroorganizama

U izvaganih 21 g krumpirovog agara (PDA) dodano je 500 mL destilirane vode. Otopina je zagrijana do vrenja, te sterilizirana u autoklavu 20 minuta pri 121 °C i tlaku od 1 do 2 bara. Nakon sterilizacije podloga je ohlađena na temperaturu od 45 do 50 °C, te dobro promiješana i prelivena u sterilne Petrijeve zdjelice. U sterilnim uvjetima na pripremljene hranjive podloge su nacijepjeni radni mikroorganizmi. Inkubacija je trajala sedam dana pri temperaturi 27 °C za uzgoj *Trametes versicolor* i 45 °C za uzgoj *Humicola grisea*. Iz ovako pripremljenih kultura izrezani su micelijski diskovi promjera 6 mm pomoću sterilnog bušača čepova i kao takvi su korišteni za pripravu inokuluma.

3.4. Uzgoj gljiva u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Kako bi osigurali rast biomase, dodavanjem odgovarajućeg volumena vode u supstrat postignuta je optimalna vlažnost supstrata za radne mikroorganizme, tj. vlažnost od 60 %. Iz podataka o početnoj vlažnosti svježih pogača buče i lana izračunat je potreban volumen destilirane vode koji je potrebno dodati za postizanje potrebne vlažnosti.

Izračun:

$$m_{H_2O} = \left(\frac{w_1}{w_2} \cdot m_{uz} \right) - m_{uz} \quad (1)$$

gdje je: m_{uz} – masa uzorka (g)
 w_1 – udio suhe tvari u uzorku (%)
 w_2 – željeni udio suhe tvari u uzorku (%)

Za bučinu pogaču određen je početni udio suhe tvari 93,07 %, a za lanenu 92,09 %. Prema tome razlikuje se i potrebna količina dodane destilirane vode kako bi se postigla željena vlažnost supstrata od 60 %. Dakle, potreban volumen vode za bučinu pogaču je 63,2 mL, a za lanenu pogaču 63,5 mL.

Izvagano je 50 g supstrata u laboratorijske staklenke, te je dodan potreban volumen destilirane vode umanjen za 10 mL koji će biti dodani tijekom inokulacije.

Pogače su prije naciepljivanja sterilizirane u autoklavu kroz 20 min na 121 °C. Ohlađene su na sobnu temperaturu, te je provedeno usitnjavanje supstrata u sterilnim uvjetima laboratorijskom špatulom na čestice veličine 1 - 2 cm kako bi se povećala ukupna površina potrebna za rast mikroorganizama, te kako bi im se osigurala dostupnost kisika. Inokulum je pripremljen u 10 mL sterilizirane destilirane vode dodatkom pet micelijskih diskova gljive *Trametes versicolor*, odnosno pet micelijskih diskova *Humicola grisea*, te miješanjem na vibrirajućoj miješalici tijekom 1 minute. Inokulacija supstrata je zatim provedena u aseptičnim uvjetima.

Za svaki radni mikroorganizam, te za svaku pogaču su pripremljene tri paralele. S obzirom na to da je inkubacija provedena u aerobnim uvjetima, poklopci svih staklenki su zamijenjeni listom papirnato g ručnika te pričvršćeni gumicom. Laboratorijske teglice sa uzorcima su stavljene u inkubator na inkubaciju i to na 27 °C za uzgoj *Trametes versicolor*, a za uzgoj *Humicola grisea* na 45 °C, te uz brzinu ventilatora od 10 %. Uzgoj je trajao 10 dana, nakon čega su sve staklenke s uzorcima sterilizirane (121 °C, 20 min).

3.5. Priprema ekstrakata za analize

3.5.1. Ekstrakcija topljivih tvari iz pogača uljarica u puferu

U plastične epruvete odvagano je po 1 g uzorka, te je dodadno 10 mL 0,1 M hladnog fosfatnog pufera (pH 7,0). Hladna ekstrakcija je provedena kroz 30 minuta, tako da se svakih 5 minuta suspenzija uzorka i pufera miješala 30 sekundi na vibrirajućoj miješalici. Između

miješanja uzorci su čuvani u hladnjaku na +4 °C. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su centrifugirani pri 15 000 g na +4 °C kroz 10 minuta. Izbistreni ekstrakti su potom dekantirani i profiltrirani kroz nabrani filter papir u Falcon epruvete. Ekstrakti su čuvani na temperaturi +4 °C do provedbe analize ekstraktibilnih proteina Bradford metodom i analize ukupnih ekstraktibilnih šećera fenol-sulfatnom metodom.

3.5.2. Kruto-tekuća ekstrakcija

Uzorci su osušeni na zraku, fino usitnjeni na ultracentrifugalnom mlinu do veličine čestica 1 mm, te je određen udio suhe tvari pomoću analizatora vlage prije provedbe kruto-tekuće ekstrakcije. U staklene tikvice odvagano je 1 g uzorka, te je dodano 20 mL destilirane vode. Tikvice s uzorcima su postavljene u vodenu kupelj s tresilicom na 30 minuta i 27 °C, pri 170 o/min, odnosno na optimalne uvjete za ekstrakciju šećera. Sve suspenzije su nakon ekstrakcije dekantirane u Falcon epruvete, te su centrifugirane 10 minuta na 30 °C pri 10 000 g. Dobiveni ekstrakt je potom filtriran kroz nabrani filter papir. Filtrati su korišteni za određivanje šećera HPLC metodom.

3.6. Analitičke metode određivanja kemijskog sastava pogača prije i nakon obrade

Sve analize su rađene u tri ponavljanja za svaki uzorak.

3.6.1. Određivanje vode sušenjem

Udio vode u pogačama određuje se standardnom metodom (ISO 665:1991) u sušioniku pri temperaturi od 103 °C ± 2 °C.

U prethodno osušenu (1 sat na 105 °C), u eksikatoru ohlađenu i odvagano aluminijsku posudicu s poklopcem, odvagano je 5 g uzorka. Posudica je stavljena u zagrijani sušionik s podignutim poklopcem. Nakon 2 sata sušenja posudica je još u sušioniku zatvorena s pripadajućim poklopcem, te stavljena u eksikator na hlađenje kroz 1 sat. Zatvorena posudica s uzorkom je izvagana, a postupak (sušenje 30 min) je ponavljan do konstantne mase (4 - 5 sati sušenja), odnosno sve dok razlika između dva uzastopna mjerenja nije bila najviše 0,005 g.

Izračun:

$$Udio\ vode\ (\%) = \frac{100 \cdot (a-b)}{c} \quad (2)$$

gdje je: a – masa posude s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa posude s uzorkom nakon sušenja (g)

c – masa odvagane količine uzorka (g)

3.6.2. Određivanje udjela mineralnih tvari

Za određivanje udjela pepela u uzorku korištena je metoda suhog spaljivanja uzorka u mufolnoj peći pri 550 °C do konstantne mase.

Neposredno prije upotrebe lončići za spaljivanje su žareni u mufolnoj peći na temperaturi od 550 °C do postojane mase, zatim su hlađeni u eksikatoru 1 sat i izvagani s točnošću od $\pm 0,1$ mg. Izvagano je 3 g uzorka u pripremljeni lončić. Uzorak je ravnomjerno raspoređen po lončiću, te se prvo spaljivao na električnom grijaču do potpune karbonizacije (oko 1 sat). Nakon toga uzorci su stavljeni u prethodno zagrijanu mufolnu peć i ostavljeni sve dok nije dobiven bijeli ili blijedo zeleni pepeo (od 4 do 6 sati spaljivanja). Po završetku spaljivanja lončići s uzorcima su stavljeni u eksikator na hlađenje (1 sat), te izvagani s točnošću od $\pm 0,1$ mg.

Izračun:

$$Udio\ pepela\ (\%) = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad (3)$$

gdje je: m_1 – masa prazne posudice (g)

m_2 – masa posudice s uzorkom prije sušenja i/ili spaljivanja (g)

m_3 – masa posudice s pepelom (g)

$$Udio\ pepela\ (\% \ s. \ t.) = \frac{Udio\ pepela\ (\%) \times 100}{Udio\ suhe\ tvari\ (\%)} \quad (4)$$

3.6.3. Određivanje udjela proteina

3.6.3.1. Određivanje proteina po Kjeldahl-u

Ovom metodom udio proteina u uzorku određuje se indirektno iz količine dušika. Postupak se sastoji od tri faze: vlažno spaljivanje/oksidacija, destilacija i titracija.

Prva faza, faza razaranja, provedena je u bloku za spaljivanje pri temperaturi od 420 °C u trajanju od 1 sata. U toj fazi uzorak je zagrijavan s koncentriranom sumpornom kiselinom (H₂SO₄) uz dodatak katalizatora (CuSO₄) i soli za povišenje vrelišta (Na₂SO₄) prilikom čega je došlo do potpune oksidacije organske tvari, a iz dušika koji se pri tome oslobodio u obliku NH₃ je u reakciji s H₂SO₄ nastao (NH₄)₂SO₄. U drugoj fazi određivanja (destilacija) reakcijom natrijeve lužine (35%-tna NaOH) i (NH₄)₂SO₄ oslobodio se amonijak koji je predestiliran vodenom parom u tikvicu s kiselinom poznatog molariteta (0,1 M HCl) u koju je dodano nekoliko kapi indikatora. Prikupljeno je oko 100 mL destilata, a destilacija se završila kada je pH destilata bio 7 (provjera indikator papirom). Višak klorovodične kiseline je u zadnjoj fazi određen titracijom sa 0,1 M NaOH.

Izračun:

$$\% N = \frac{(a-b) \cdot f \cdot 0,14}{c} \quad (5)$$

gdje je: % *N* – udio dušika

a – 0,1 M otopina NaOH upotrebljenog za titraciju slijepa probe (mL)

b – 0,1 M otopina NaOH upotrebljenog za titraciju glavne probe (mL)

f – faktor upotrebljenog 0,1 M NaOH (1)

c – masa uzorka (g)

$$\text{Udio bjelančevina (\%)} = \% N \cdot f \quad (6)$$

gdje je: % *N* – udio dušika

f – faktor za izračunavanje udjela bjelančevina u bučinoj pogači iznosi 5,3 (Jones, 1931.), a u pogači lana 6,25 (Jeon i Ikins, 1995.)

$$\text{Udio bjelančevina (\% s. t.)} = \frac{\text{Udio bjelančevina (\%)} \times 100}{\text{Udio suhe tvari (\%)}} \quad (7)$$

3.6.3.2. Određivanje koncentracije ekstraktibilnih proteina Bradford metodom

Metoda za određivanje koncentracije proteina temelji se na vezanju Coomassie Brilliant Blue G-250 za proteine. Vezanje boje za protein, odnosno stvaranje kompleksa protein-boja uzrokuje pomak u apsorpcijskom maksimumu boje sa 465 na 595 nm u kiselom mediju (Bradford, 1976.).

Za određivanje koncentracije proteina u ekstraktima dobivenim hladnom ekstrakcijom, u PMMA kivete dodano je 100 μ L ekstrakta i 2 mL Bradford reagensa. Nakon 5 min izmjeren je maksimum apsorbanacije pri 595 nm. Za pripremu slijepe probe korišten je 0,1 M fosfatni pufer pH 7,0. Ovisno o količini proteina u ekstraktima prethodno su pripremljena odgovarajuća razrjeđenja uzoraka.

Izračun:

$$y \text{ (mg/mL)} = \frac{(A_{GP,595 \text{ nm}} - A_{SP,595 \text{ nm}}) \cdot B_f \cdot D_f}{V_{uzorak}} \quad (8)$$

gdje je: y – masena koncentracija proteina (mg/mL)

$A_{GP,595 \text{ nm}}$ – apsorbanacija glavne probe izmjerene na valnoj duljini od 595 nm

$A_{SP,595 \text{ nm}}$ – apsorbanacija slijepe probe izmjerene na valnoj duljini od 595 nm

B_f – Bradford faktor

D_f – faktor razrjeđenja

V_{uzorak} – volumen uzorka dodanog u test (mL)

$$m_{\text{proteini}} \text{ (g/kg s. t.)} = \frac{y \times V_{\text{ekstrakt}} \times 100}{\text{Udio suhe tvari (\%)}} \quad (9)$$

gdje je: y – masena koncentracija proteina (mg/mL)

V_{ekstrakt} – volumen ekstrakta dobivenog hladnom ekstrakcijom (mL)

$$\text{Udio proteina (\% s. t.)} = \frac{m_{\text{proteini}} \times 100}{1000} \quad (10)$$

3.6.4. Određivanje masti po Soxhlet-u

Metoda po Soxhletu se temelji na ekstrakciji lipida iz uzorka pomoću organskog otapala, te se na taj način određuje slobodna mast u uzorku.

Odvagano je oko 5 g uzorka u odmašćeni tuljak za ekstrakciju na analitičkoj vagi, te je uzorak pokriven vatom. Tikvica po Soxhletu s nekoliko kuglica za vrenje, prethodno je osušena na temperaturi od 100 – 102 °C jedan sat, zatim ohlađena u eksikatoru 30 minuta, te je nakon toga izvagana na analitičkoj vagi. Tuljak je stavljen u ekstraktor aparata po Soxhletu, spojena je tikvica i dodano oko 150 mL petroletera. Ekstrakcija je trajala 4 sata, odnosno ekstraktor se ispraznio barem 30 puta. Otapalo je zatim predestilirano, ostatak je otparen na vodenoj kupelji, a tikvica osušena u sušioniku na temperaturi od 100 – 102 °C. Tikvica je ohlađena u eksikatoru 30 minuta i izvagana na analitičkoj vagi. Sušenje je ponavljano u intervalima od 30 minuta do konstantne mase (2 sata sušenja).

Izračun:

$$Udio\ masti\ (\%) = \frac{a \cdot 100}{b} \quad (11)$$

gdje je: a – masa ekstrahirane masti (g)

b – masa ispitivanog uzorka (g)

$$Udio\ masti\ (\% \text{ s. t.}) = \frac{Udio\ masti\ (\%) \times 100}{Udio\ suhe\ tvari\ (\%)} \quad (12)$$

3.6.5. Određivanje vlakana prema Van Soest-u

Prilikom određivanja NDF-a uzorak se tretira neutralnom detergent otopinom kako bi se otopili šećeri, škrob i pektin. Zaostali materijal se sastoji od nerazgradivih ili manje razgradivih spojeva koji čine staničnu stjenku, kao što su hemiceluloza, celuloza i lignin. Primjenom kisele detergent otopine na takav materijal hemiceluloza se otapa, te zaostaju samo celuloza i lignin koji predstavljaju ADF. U posljednjoj fazi, za određivanje ADL-a zaostali materijal se tretira sumpornom kiselinom koja razgrađuje celulozu, te ostaje samo lignin. Ovi koraci se mogu provoditi uzastopno ili odvojeno (Möller, 2014.).

3.6.5.1. Određivanje neutralnih detergent vlakana (NDF)

Uzorci su osušeni u sušioniku na temperaturi od 45 °C i samljeveni u ultracentrifugalnom mlinu na veličinu čestica od 1 mm. Izvagano je 1 g uzorka u prethodno pripremljene (sušenje 1 sat na 100 °C i hlađenje u eksikatoru 30 minuta) i izvagane gučeve (porozitet P2, 40 μm – 60 μm). Gučevi s uzorcima stavljeni su u ležište Velp uređaja (**Slika 3**), a nakon toga je u gučeve dodan natrijev sulfit, neutralna detergent otopina, te nekoliko kapi *n*-oktanol (sredstvo protiv pjenjenja). Otopina je zagrijana do vrenja nakon čega je provedeno refluksiranje kroz 60 minuta. Sadržaj gučeva je zatim ispran i profiltriran tri puta vrućom destiliranom vodom, te dva puta sa hladnim acetonom. Gučevi su osušeni na temperaturi od 105 °C tijekom 8 sati, ohlađeni u eksikatoru kroz 1 sat i izvagani.

Izračun:

$$Udio\ NDF\ (\%) = \frac{(m_1+m_2)-m_1}{m_3} \cdot 100 \quad (13)$$

gdje je: *Udio NDF* – udio neutralnih detergent vlakana (%)

m_1 – masa praznog guča (g)

m_2 – masa ostatka (g)

m_3 – masa uzorka (g)

$$Udio\ NDF\ (\% \ s. \ t.) = \frac{Udio\ NDF\ (\%) \times 100}{Udio\ suhe\ tvari\ (\%)} \quad (14)$$



Slika 3 Uređaj za određivanje sirovih vlakana (Velp Scientifica, FIWE 3)

3.6.5.2. Određivanje kiselih detergent vlakana (ADF)

Uzorci su osušeni u sušioniku na temperaturi od 45 °C i samljeveni u ultracentrifugalnom mlinu na veličinu čestica od 1 mm. Izvagano je 1 g uzorka u prethodno pripremljene (sušenje 1 sat na 100 °C i hlađenje u eksikatoru 30 minuta) i izvagane gučeve (porozitet P2, 40 μm – 60 μm). Gučevi s uzorcima stavljeni su u ležište Velp uređaja, a nakon toga je u gučeve dodana kisela detergent otopina, te nekoliko kapi n-oktanola (sredstvo protiv pjenjenja). Otopina je zagrijana do vrenja nakon čega je provedeno refluksiranje kroz 60 minuta. Sadržaj gučeva je zatim ispran i profiltriran tri puta vrućom destiliranom vodom, te dva puta sa hladnim acetonom. Gučevi su osušeni na temperaturi od 105 °C tijekom 8 sati, ohlađeni u eksikatoru kroz 1 sat i izvagani.

Izračun:

$$Udio\ ADF\ (\%) = \frac{(m_1 + m_2) - m_1}{m_3} \cdot 100 \quad (15)$$

gdje je: *Udio ADF* – udio kiselih detergent vlakana (%)

m_1 – masa praznog guča (g)

m_2 – masa ostatka (g)

m_3 – masa uzorka (g)

$$Udio\ ADF\ (\% \ s. \ t.) = \frac{Udio\ ADF\ (\%) \times 100}{Udio\ suhe\ tvari\ (\%)} \quad (16)$$

3.6.5.3. Određivanje kiselog detergenta lignina (ADL)

Gučevi s uzorcima nakon ADF analize (sušeni 8 sati, hladjeni 1 sat) stavljeni su u ležište Velp uređaja, a nakon toga je u gučeve dodana 72%-tna sumporna kiselina, te je provedena hladna ekstrakcija tijekom 3 sata s miješanjem sadržaja svakih sat vremena. Sadržaj gučeva je zatim ispran i profiltriran tri puta vrućom destiliranom vodom (odnosno dokle god je bila prisutna kisela reakcija, provjera sa indikator papirom), te dva puta sa hladnim acetonom. Gučevi su osušeni na temperaturi od 105 °C tijekom 8 sati, ohlađeni u eksikatoru kroz 1 sat i izvagani.

Izračun:

$$Udio\ ADL\ (\%) = \frac{(m_1 + m_2) - m_1}{m_3} \cdot 100 \quad (17)$$

gdje je: *Udio ADL* – udio kiselog detergent lignina (%)

m_1 – masa praznog guča (g)

m_2 – masa ostatka (g)

m_3 – masa uzorka (g)

$$Udio\ ADL\ (\% \ s. \ t.) = \frac{Udio\ ADL\ (\%) \times 100}{Udio\ suhe\ tvari\ (\%)} \quad (18)$$

3.6.6. Određivanje šećera

3.6.6.1. Određivanje ukupnih ekstraktibilnih šećera fenol-sulfatnom metodom

Analiza je provedena na ekstraktima dobivenim tijekom hladne ekstrakcije u fosfatnom puferu. Određivanje ukupnih ekstraktibilnih šećera fenol-sulfatnom metodom provedeno je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 490 nm.

U staklene epruvete dodani su prethodno razrijeđeni ekstrakti, 4%-tna vodena otopina fenola i 96%-tna sumporna kiselina. Sadržaj je zatim vorteksiran nekoliko sekundi. Nakon 2

minute izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini od 490 nm u PMMA kivetama. Za pripremu slijepe probe korišten je 0,1 M fosfatni pufer (pH 7,0).

Izračun:

$$y \text{ (mg/mL)} = \frac{(A_{GP,490 \text{ nm}} - A_{SP,490 \text{ nm}}) \cdot f \cdot D_f}{V_{uzorak}} \quad (19)$$

gdje je: y – masena koncentracija ukupnih šećera (mg/mL)

$A_{GP,490 \text{ nm}}$ – apsorbancija glavne probe izmjerene na valnoj duljini od 490 nm

$A_{SP,490 \text{ nm}}$ – apsorbancija slijepe probe izmjerene na valnoj duljini od 490 nm

f – faktor za izračunavanje mase ukupnih šećera

D_f – faktor razrjeđenja

V_{uzorak} – volumen uzorka dodanog u test (mL)

$$m_{\text{šećeri}} \text{ (g/kg s. t.)} = \frac{y \times V_{\text{ekstrakt}} \times 100}{\text{Udio suhe tvari (\%)}} \quad (20)$$

gdje je: y – masena koncentracija ukupnih šećera (mg/mL)

V_{ekstrakt} – volumen ekstrakta dobivenog hladnom ekstrakcijom (mL)

$$\text{Udio šećera (\% s. t.)} = \frac{m_{\text{šećeri}} \times 100}{1000} \quad (21)$$

3.6.6.2. Određivanje šećera HPLC metodom

Za određivanje šećera tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (HPLC) korišteni su ekstrakti dobiveni kruto-tekućom ekstrakcijom.

Prije same analize uzorci su dodatno profiltrirani na membranskom filteru za šprice s porama promjera 0,22 μm u viala, odnosno bočice za uzorke, te su kao takvi ekstrakti korišteni za određivanje koncentracije šećera pomoću HPLC uređaja (**Slika 4**). Viala su postavljene u automatski uzorkivač. Za otplinjavanje mobilne faze korištena je ultrazvučna kupelj.



Slika 4 UHPLC, Shimadzu Nexera XR

Udjeli pojedinačnih šećera u uzorcima analizirane su prema sljedećim uvjetima:

~ analitička kolona	InertSustain NH ₂
~ mobilna faza	acetonitril : ultračista voda = 75 : 25
~ protok mobilne faze	1 mL/min
~ volumen injektiranog uzorka	10 µL
~ vrijeme eluiranja	20 minuta
~ tlak	40 bara
~ temperatura kolonske pećnice	40 °C

Dobiveni kromatogrami korišteni su za kvalitativnu i kvantitativnu analizu šećera u uzorcima. Identifikacija komponenti, odnosno kvalitativna analiza, provedena je usporedbom vremena zadržavanja pojedinačnih šećera u uzorcima s vremenima zadržavanja nakon injektiranja poznatog standarda šećera određene koncentracije. Kvantitativna analiza šećera u uzorcima provedena je pomoću odgovarajućeg softvera za obradu podataka (LabSolution), određivanjem površine ispod pikova na temelju prethodno izrađenih kalibracijskih krivulja. Maseni udjeli pojedinih šećera u ekstraktima svježih i biološki obrađenih uljnih pogača su potom preračunate na suhu tvar uzorka.

Izračun:

$$C = \frac{c \cdot V_e}{m_{uz} \cdot w_{s.t.}} \cdot 100 \quad (22)$$

gdje je: C – maseni udio šećera u ekstraktu (mg/g_{s.t.})

c – masena koncentracija šećera u ekstraktu (mg/mL)

V_e – volumen ekstrakta (mL)

m_{uz} – masa uzorka (g)

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

3.5.8. Analiza ukupnog i anorganskog ugljika na TOC analizatoru

Metoda određivanja ukupnog organskog ugljika temelji se na potpunoj oksidaciji organskih tvari do ugljikovog dioksida i vode, te se primjenjuje kao kvantitativni pokazatelj prisutnosti organske tvari.

Kako bi se odredio ukupni organski ugljik (TOC), prvo se mjeri ukupni ugljik (TC) i ukupni anorganski ugljik (IC).

3.5.8.1. Određivanje ukupnog ugljika (TC)

Keramičke lađice su prije rada spaljene u mufolnoj peći 1 sat na 550 °C, hladene u eksikatoru 1 sat i izvagane, te je u njih odvagano 30 mg uzorka. Uzorak je prekriven tankim slojem keramičke vune. Odabrana je pripadajuća kalibracijska krivulja pomoću koje se određuje vrijednost ukupnog ugljika. Lađica s uzorkom je potom stavljena u jedinicu za čvrste uzorke na TOC analizatoru (**Slika 5**). Po isteku 3 minute lađica je pomaknuta u „measuring“ položaj, te je očitana vrijednost udjela ukupnog ugljika u uzorku. Temperatura pri kojoj se provodi mjerenje TC-a je 900 °C.



Slika 5 Analizator ugljika TOC (Shimadzu TOC-LCPH/CPN, SSM-5000A)

3.5.8.2. Određivanje anorganskog ugljika (IC)

Keramičke lađice su prije rada spaljene u mufolnoj peći 1 sat na 550 °C, hladene u eksikatoru 1 sat i izvagane, te je u njih odvagano 30 mg uzorka. Odabrana je pripadajuća kalibracijska krivulja pomoću koje se određuje vrijednost anorganskog ugljika. Lađica s uzorkom je potom stavljena u jedinicu za čvrste uzorke na TOC analizatoru. Po isteku 3 minute u lađicu je dodana 25%-tna fosforna kiselina, lađica je pomaknuta u „measuring“ položaj, te je očitana vrijednost udjela anorganskog ugljika u uzorku. Temperatura pri kojoj se provodi mjerenje IC-a je 200 °C.

3.5.8.3. Određivanje ukupnog organskog ugljika (TOC)

Udio ukupnog organskog ugljika u uzorku jednaka je razlici vrijednosti udjela ukupnog ugljika i anorganskog ugljika u uzorku.

Izračun:

$$TOC (\%) = TC - IC \quad (23)$$

gdje je: TOC – udio ukupnog organskog ugljika u uzorku (%)

TC – udio ukupnog ugljika u uzorku (%)

IC – udio anorganskog ugljika u uzorku (%)

$$TOC (\% s. t.) = \frac{TOC (\%) \times 100}{Udio suhe tvari (\%)} \quad (24)$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje kemijskog sastava bučine i lanene pogače prije obrade

Udio suhe tvari, pepela, proteina, masti, vlakana (NDF, ADF, ADL), ekstraktibilnih šećera, te ukupnog organskog ugljika u pogačama buče i lana prije biološke obrade s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* prikazani su u **Tablici 3**.

Tablica 3 Kemijski sastav pogače buče i lana prije biološke obrade

Parametar	Mjerna jedinica	Bučina pogača	Lanena pogača
Suha tvar	%	93,07 ± 0,00	92,09 ± 0,00
Pepeo	% s.t.	7,82 ± 0,00	5,30 ± 0,00
Ukupni proteini	% s.t.	38,27 ± 0,56	33,26 ± 0,00
Ekstraktibilni proteini	% s.t.	5,71 ± 0,18	5,03 ± 0,19
Masti	% s.t.	36,55 ± 0,00	21,75 ± 0,00
NDF	% s.t.	11,81 ± 1,43	18,83 ± 1,87
ADF	% s.t.	5,12 ± 1,77	14,22 ± 0,30
ADL	% s.t.	1,41 ± 1,20	6,02 ± 0,35
Ekstraktibilni šećeri	% s.t.	2,64 ± 0,46	2,02 ± 0,58
TOC	% s.t.	73,47 ± 0,62	69,48 ± 0,41

Dobiveni eksperimentalni podaci su uglavnom u skladu s literaturnim vrijednostima, gdje se udio suhe tvari u pogači buče kreće u rasponu od 91,80 % do 96,50 %, pepela od 6,50 % s.t. do 9,09 % s.t., proteina od 29,39 % s.t. do 63,52 % s.t., ekstraktibilnih šećera od 1,10 % s.t. do 15,88 % s.t., masti od 5,92 % s.t. do 31,30 % s.t., a vrijednost za NDF iznosi 10,51 % s.t. (Zdunczyk i sur., 1999.; Peričin i sur., 2008.; Radočaj i sur., 2012.; Cozea i sur., 2016.; Bochkarev i sur., 2016.; Krimer Malešević, 2016.). Vrijednosti u literaturi za pogaču lana se za udio suhe tvari kreću od 89,35 % do 93,10 %, pepeo od 3,40 % s.t. do 5,40 % s.t., proteini od 14,40 % s.t. do 38,10 % s.t., masti od 6,60 % s.t. do 29,37 % s.t., a vrijednost za NDF je 19,40 % s.t., te za ADF 13,00 % s.t. (Gutiérrez i sur., 2010.; Bochkarev i sur., 2016.; Cozea i sur., 2016.; Halle i Schöne, 2013.; Ogunronbi i sur., 2011.; Krimer Malešević, 2016.). Kemijski sastav pogača se razlikuje ovisno o sorti, uvjetima uzgoja, metodi ekstrakcije ulja i drugim faktorima (Ramachandran i sur., 2007.). Iz rezultata u **Tablici 3** je vidljivo da se sastav pogače buče najviše razlikuje od sastava pogače lana u udjelima masti i vlakana, te tako bučina pogača ima udio masti od 36,55 % s.t. u odnosu na 21,75 % s.t. u pogači lana. Pogača lana pak sadrži više vlakana (NDF, ADF, ADL) od bučine pogače.

4.2. Biološka obrada bučine pogače

4.2.1. Biološka obrada bučine pogače pomoću *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*

Nakon biološke obrade s *Trametes versicolor* udio suhe tvari u bučinoj pogači iznosio je 44,72 %, a nakon obrade s *Humicola grisea* mnogo više, odnosno 92,30 %. Udio mineralnih tvari, odnosno pepela je nakon obrade pogače s oba mikroorganizma nešto veći u odnosu na udio od 7,82 % s.t. kod neobrađene pogače, te je tako iznosio 8,59 % s.t. nakon obrade s *Trametes versicolor* i 8,64 % s.t. nakon obrade s *Humicola grisea*. U **Tablici 4** vidljivo je da je nakon obrade pogače s *Trametes versicolor* došlo do smanjenja udjela ukupnih i ekstraktibilnih proteina, te su oni redom iznosili 36,50 % s.t. i 0,81 % s.t. Nakon obrade pogače s *Humicola grisea* udio ukupnih proteina je porastao sa početnih 38,27 % s.t. na 41,91 % s.t., a udio ekstraktibilnih proteina je smanjen na 0,45 % s.t. sa vrijednosti od 5,71 % s.t. u pogači prije obrade. Sadržaj masti je niži nakon obrade s oba mikroorganizma u odnosu na početnu vrijednost u svježoj pogači (36,55 % s.t.), te je nakon obrade s *Trametes versicolor* iznosio 16,28 % s.t., a 31,35 % s.t. nakon obrade pogače s *Humicola grisea*. Izmjerene vrijednosti za udio vlakana također su bile manje nakon obrade nego kod početnog uzorka pogače buče gdje su redom iznosile za NDF 11,81 % s.t., ADF 5,12 % s.t., ADL 1,41 % s.t. Nakon obrade s *Humicola grisea* te vrijednosti su bile za NDF 10,04 % s.t., ADF 4,98 % s.t., ADL 1,42 % s.t., a nakon obrade s *Trametes versicolor* vrijednosti su bile još niže i to NDF 3,34 % s.t., ADF 1,25 % s.t., ADL 0,15 % s.t. Udio ekstraktibilnih šećera nakon obrade s *Trametes versicolor* je bio 1,26 % s.t., a nakon obrade s *Humicola grisea* iznosio je 1,56 % s.t., dakle u oba slučaja manje od 2,64 % s.t. koliko je bilo u pogači prije obrade. Pogača buče imala je udio ukupnog organskog ugljika (TOC) 73,47 % s.t., koji je nešto manji od udjela u obrađenim uzorcima. Nakon obrade s *Trametes versicolor* taj udio je bio 73,86 % s.t., a 74,70 % s.t. nakon obrade s *Humicola grisea*.

Tablica 4 Kemijski sastav pogače buče prije i nakon biološke obrade s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*

Parametar	Mjerna jedinica	Prije obrade	Nakon obrade s <i>Trametes versicolor</i>	Nakon obrade s <i>Humicola grisea</i>
Suha tvar	%	93,07 ± 0,00	44,72 ± 1,78	92,30 ± 0,08
Pepeo	% s.t.	7,82 ± 0,00	8,59 ± 0,41	8,64 ± 0,05
Ukupni proteini	% s.t.	38,27 ± 0,56	36,50 ± 1,44	41,91 ± 0,25
Ekstraktibilni proteini	% s.t.	5,71 ± 0,18	0,81 ± 0,13	0,45 ± 0,02
Masti	% s.t.	36,55 ± 0,00	16,28 ± 1,10	31,35 ± 0,57
NDF	% s.t.	11,81 ± 1,43	3,34 ± 0,19	10,04 ± 0,16
ADF	% s.t.	5,12 ± 1,77	1,25 ± 0,03	4,98 ± 0,15
ADL	% s.t.	1,41 ± 1,20	0,15 ± 0,01	1,42 ± 0,17
Ekstraktibilni šećeri	% s.t.	2,64 ± 0,46	1,26 ± 0,44	1,56 ± 0,37
TOC	% s.t.	73,47 ± 0,62	73,86 ± 6,11	74,70 ± 0,61

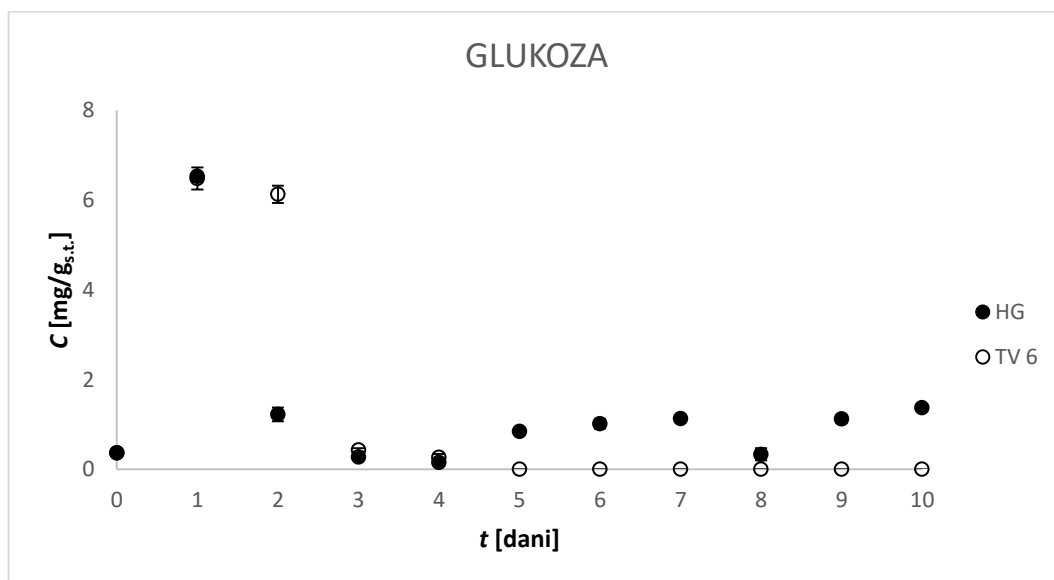
Rezultati kemijskog sastava pogače buče nakon 10 dana obrade s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* su podjednaki, veće razlike su uočljive kod udjela suhe tvari, masti, te vlakana. *Trametes versicolor* je razgradio masti i vlakna u većoj mjeri od *Humicola grisea*.

4.2.2. Promjena masenog udjela pojedinačnih šećera tijekom biološke obrade bučine pogače s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*

Eksperimentalno dobivene vrijednosti masenih udjela pojedinačnih šećera (glukoza, fruktoza, saharoza, maltoza i maltotrioza) identificiranih u ekstraktima dobivenim kruto-tekućom ekstrakcijom neobrađenih i biološki obrađenih uzoraka pogače buče sa *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* prikazane su grafički (**Slike 6-10**). Biološka obrada je provedena tijekom deset dana fermentacija, a uzorci su uzimani svaki dan tijekom fermentacije.

Iz rezultata na **Slici 6** vidljivo je da je u neobrađenom uzorku udio glukoze iznosio 0,37 mg/g_{s.t.}. Prilikom biološke obrade bučine pogače sa *Trametes versicolor* maseni udio glukoze se prvog i drugog dana kreće u rasponu od 6,13 do 6,48 mg/g_{s.t.}. Udio glukoze zatim naglo opada, te su vrijednosti za treći i četvrti dan redom 0,43 mg/g_{s.t.} i 0,27 mg/g_{s.t.}. U periodu od petog do desetog dana obrade u uzorku nije detektirana glukoza, te se može zaključiti da je *Trametes versicolor* metabolizirao glukozu brže no što je ona nastajala hidrolizom složenih polisaharida. Kod obrade pogače s *Humicola grisea* maseni udio glukoze

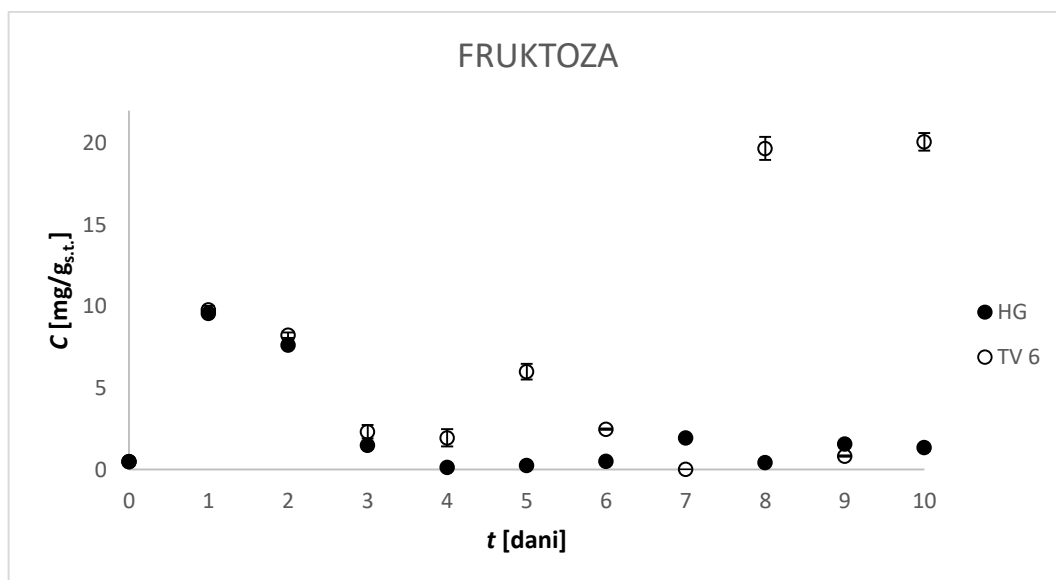
nakon prvog dana je porastao na 6,53 mg/g_{s.t.}, nakon čega se od 2. do 10. dana kretao u rasponu od 0,15 do 1,37 mg/g_{s.t.}, što znači da i *Humicola grisea* koristi glukozu za rast i razvoj.



Slika 6 Maseni udio glukoze (C) u ekstraktima biološki obrađene bučine pogače s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

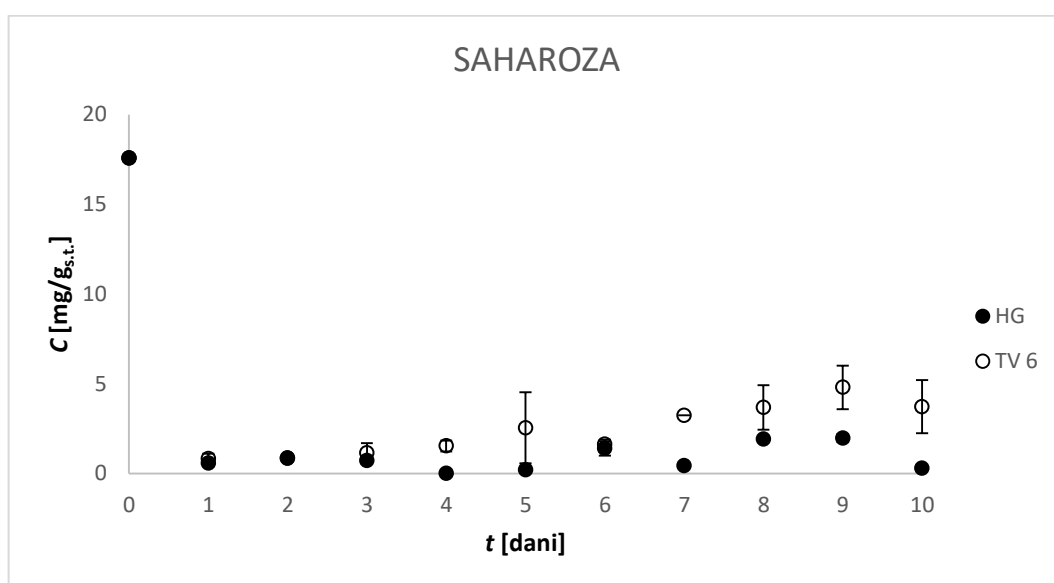
Na **Slici 7** je prikazana ovisnost masenog udjela fruktoze o vremenu fermentacije tijekom biološke obrade bučine pogače. U uzorku prije naciepljivanja s *Trametes versicolor* ili *Humicola grisea* detektirana je fruktoza, i to u masenom udjelu od 0,48 mg/g_{s.t.}. Nakon prvog dana maseni udio fruktoze je porastao u oba uzorka, te je tako iznosio 9,78 mg/g_{s.t.} u uzorku obrađenom s *Trametes versicolor*, te 9,57 mg/g_{s.t.} u uzorku obrađenom s *Humicola grisea*. Maseni udio fruktoze drugog dana počinje opadati, te iznosi 8,23 mg/g_{s.t.} nakon obrade s *Trametes versicolor*, i 7,62 mg/g_{s.t.} nakon obrade s *Humicola grisea*. Od 3. do 10. dana maseni udio fruktoze u uzorku obrađenom s *Humicola grisea* kreće se od 0,12 do 1,93 mg/g_{s.t.}, te se može zaključiti da *Humicola grisea* metabolizira fruktozu. Za uzorak obrađen s *Trametes versicolor* maseni udio fruktoze je nastavio opadati do 4. dana kada je iznosio 1,94 mg/g_{s.t.}, nakon čega je narastao na 6,00 mg/g_{s.t.} nakon petog dana. Šesti dan je maseni udio pao na 2,47 mg/g_{s.t.}, a sedmog dana nije detektirana prisutnost fruktoze. Nagli porast je izmjeren osmog dana (19,68 mg/g_{s.t.}), nakon čega je uslijedio pad na udio od

0,82 mg/g_{s.t.} devetog dana. Nakon desetog dana opet je detektiran nagli porast, te ujedno i najviša vrijednost za maseni udio fruktoze u obrađenoj bučinoj pogači u iznosu od 20,09 mg/g_{s.t.}. Nagli rast masenog udjela fruktoze posljedica je razgradnje složenih ugljikohidrata, a nagli pad iste je znak da *Trametes versicolor* koristi fruktozu za rast i razvoj nakon što je metabolizirao svu glukozu iz supstrata.



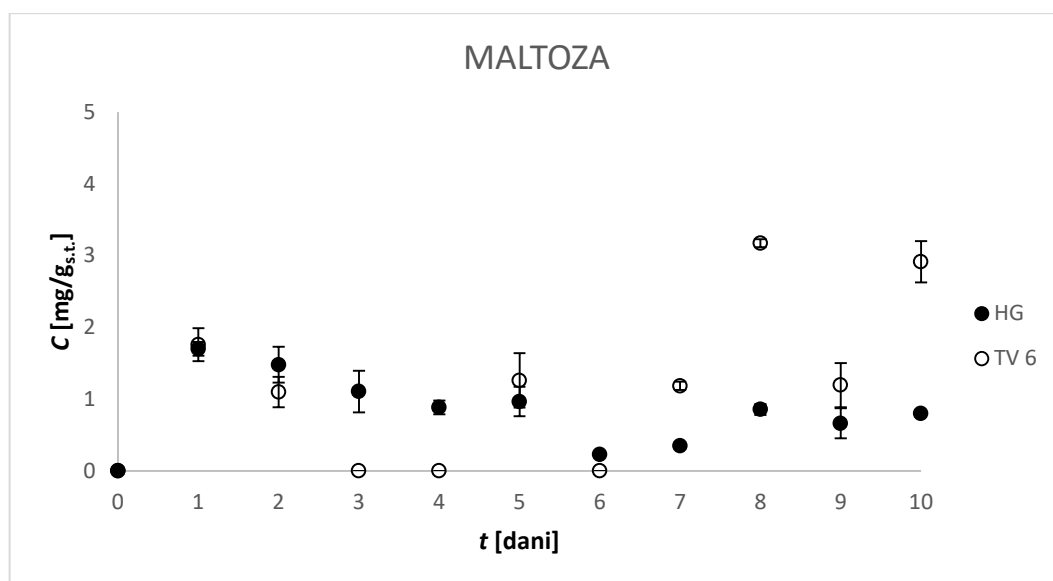
Slika 7 Maseni udio fruktoze (C) u ekstraktima biološki obrađene bučine pogače s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

U prikazu ovisnosti masenog udjela saharoze o vremenu fermentacije tijekom biološke obrade na **Slici 8** vidljivo je da je u neobrađenom uzorku bučine pogače detektirana saharoza u koncentraciji 17,59 mg/g_{s.t.}. Prilikom biološke obrade, kako sa *Trametes versicolor*, tako i sa *Humicola grisea*, rezultati su podjednaki, te je maseni udio saharoze znatno niži nakon prvog dana, u odnosu na neobrađeni uzorak. Tako se se maseni udio kreće od 0,83 do 4,80 mg/g_{s.t.} od prvog do desetog dana obrade s *Trametes versicolor*, pri čemu je udio saharoze nakon desetog dana 3,73 mg/g_{s.t.}. U uzorku koji je obrađivan s *Humicola grisea* maseni udio saharoze je četvrtog dana pao na 0,00 mg/g_{s.t.}, nakon čega je od petog do desetog dana bio u rasponu od 0,21 do 1,98 mg/g_{s.t.}, dok je nakon zadnjeg dana biološke obrade taj udio iznosio 0,30 mg/g_{s.t.}. Iz rezultata je vidljivo da oba mikroorganizma hidroliziraju saharozu, dok ona istovremeno nastaje razgradnjom složenijih ugljikohidrata.



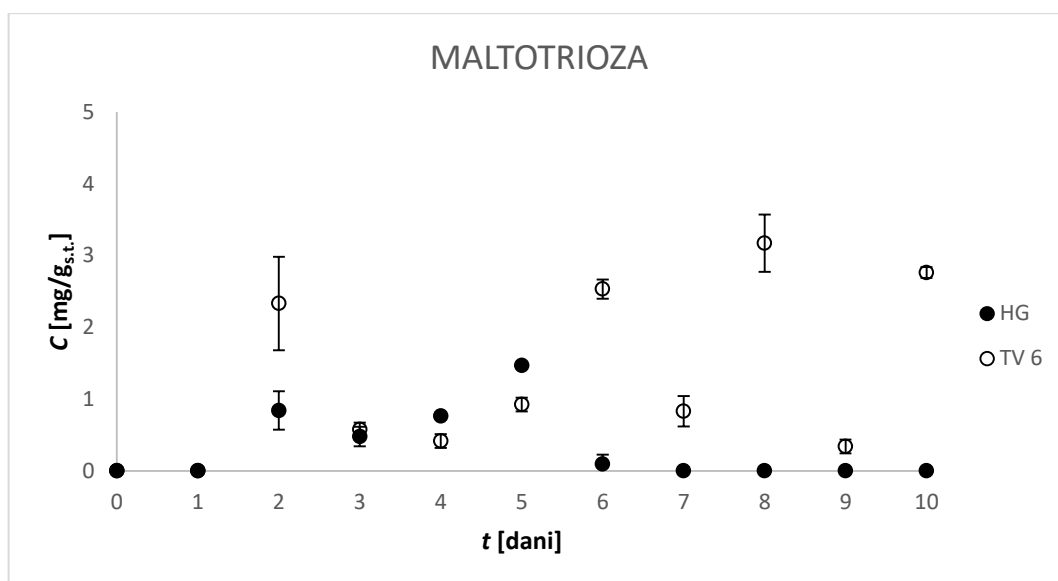
Slika 8 Maseni udio saharoze (C) u ekstraktima biološki obrađene bučine pogače s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

Na **Slici 9** je prikazana ovisnost masenog udjela maltoze o vremenu biološke obrade, te je vidljivo da u neobrađenoj pogači maltoza nije prisutna. Već nakon prvog dana detektirana je u koncentraciji od 1,76 mg/g_{s.t.} prilikom obrade s *Trametes versicolor*, odnosno 1,70 mg/g_{s.t.} prilikom obrade s *Humicola grisea*. Iz rezultata je vidljivo da dolazi do hidrolize maltoze prilikom obrade pogače s oba mikroorganizma, no ipak u nešto većoj mjeri kada je pogača obrađivana s *Humicola grisea*. Nakon desetog dana biološke obrade u uzorku obrađenom s *Trametes versicolor* maseni udio maltoze je 2,91 mg/g_{s.t.}, a u uzorku obrađenom s *Humicola grisea* taj udio iznosi 0,80 mg/g_{s.t.}.



Slika 9 Maseni udio maltoze (C) u ekstraktima biološki obrađene bučine pogače s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

U neobrađenoj bučinoj pogači nije detektirana prisutnost maltotrioze, a kako je vidljivo na **Slici 10** maseni udio iste porastao je tek drugi dan, bilo da se radilo o obradi sa *Trametes versicolor* (2,33 mg/g_{s.t.}) ili o obradi sa *Humicola grisea* (0,84 mg/g_{s.t.}). Kod obrade bučine pogače s *Humicola grisea* najveća vrijednost masenog udjela maltotrioze je petog dana i to 1,47 mg/g_{s.t.}, a nakon toga opada, te od sedmog do desetog dana obrade maltotrioza nije detektirana u uzorku. Prilikom biološke obrade pogače s *Trametes versicolor* maseni udio maltotrioze se od trećeg do petog dana kreće u rasponu od 0,42 do 0,93 mg/g_{s.t.}, nakon čega je vidljiv sličan trend kao i kod maltoze, sa završnom vrijednošću desetog dana od 2,77 mg/g_{s.t.}. Prema prikazanim vrijednostima može se zaključiti kako *Humicola grisea* metabolizira maltotriozu u većoj mjeri od *Trametes versicolor*.



Slika 10 Maseni udio maltotrioze (C) u ekstraktima biološki obrađene bučine pogače s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

4.3. Biološka obrada lanene pogače

4.3.1. Biološka obrada lanene pogače pomoću *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*

Nakon biološke obrade s *Trametes versicolor* udio suhe tvari u pogači lana iznosio je 37,60 %, a nakon obrade s *Humicola grisea* 91,98 %. Udio mineralnih tvari, odnosno pepela je nakon obrade pogače s oba mikroorganizma nešto veći u odnosu na udio od 5,30 % s.t. kod neobrađene pogače, te je tako iznosio 5,38 % s.t. nakon obrade s *Humicola grisea* i 7,43 % s.t. nakon obrade s *Trametes versicolor*. U pogači lana prije obrade udio ukupnih proteina iznosio je 33,26 % s.t., a nakon obrade s *Humicola grisea* 43,59 % s.t., te čak 50,05 % s.t. nakon obrade s *Trametes versicolor*. Udio ekstraktibilnih proteina se u oba slučaja smanjio sa 5,03 % s.t. u neobrađenoj pogači lana na 1,22 % s.t. nakon obrade s *Trametes versicolor*, odnosno na 0,30 % s.t. nakon obrade s *Humicola grisea*. U **Tablici 5** vidljivo je smanjenje udjela masti sa 21,75 % s.t. u svježoj pogači na 15,06 % s.t. nakon biološke obrade s *Humicola grisea*. Značajnije smanjenje je zabilježeno kod uzorka obrađenog s *Trametes versicolor*, gdje je udio masti iznosio 3,43 % s.t. Izmjerene vrijednosti za udio vlakana također su bile manje nakon obrade nego kod početnog uzorka pogače lana gdje su redom iznosile za NDF 18,83 % s.t., ADF 14,22 % s.t., ADL 6,02 % s.t. Nakon obrade s *Humicola grisea* te

vrijednosti su bile za NDF 16,79 % s.t., ADF 12,53 % s.t., ADL 4,40 % s.t., a nakon obrade s *Trametes versicolor* vrijednosti su bile nešto niže i to NDF 16,42 % s.t., ADF 11,04 % s.t., ADL 4,15 % s.t. Obradom pogače lana povećao se udio ekstraktibilnih šećera sa početnih 2,02 % s.t. na 10,09 % s.t. nakon obrade s *Humicola grisea*, te na čak 17,38 % s.t. u slučaju obrade s *Trametes versicolor*. Pogača lana imala je udio ukupnog organskog ugljika (TOC) 69,48 % s.t., koji je nešto manji od udjela u obrađenim uzorcima. Nakon obrade s *Trametes versicolor* taj udio je bio 70,73 % s.t., a 71,27 % s.t. nakon obrade s *Humicola grisea*.

Tablica 5 Kemijski sastav pogače lana prije i nakon biološke obrade s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*

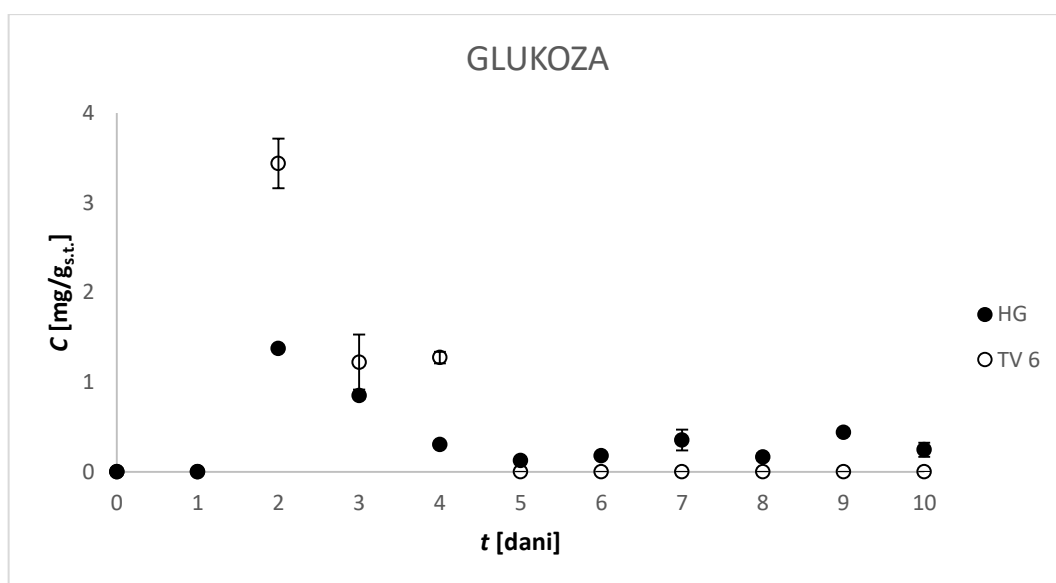
Parametar	Mjerna jedinica	Prije obrade	Nakon obrade s <i>Trametes versicolor</i>	Nakon obrade s <i>Humicola grisea</i>
Suha tvar	%	92,09 ± 0,00	37,60 ± 1,18	91,98 ± 0,09
Pepeo	% s.t.	5,30 ± 0,00	7,43 ± 0,71	5,38 ± 0,01
Ukupni proteini	% s.t.	33,26 ± 0,00	50,05 ± 0,33	43,59 ± 0,27
Ekstraktibilni proteini	% s.t.	5,03 ± 0,19	1,22 ± 0,05	0,30 ± 0,01
Masti	% s.t.	21,75 ± 0,00	3,43 ± 0,98	15,06 ± 0,06
NDF	% s.t.	18,83 ± 1,87	16,42 ± 0,18	16,79 ± 0,18
ADF	% s.t.	14,22 ± 0,30	11,04 ± 0,22	12,53 ± 0,22
ADL	% s.t.	6,02 ± 0,35	4,15 ± 0,37	4,40 ± 0,14
Ekstraktibilni šećeri	% s.t.	2,02 ± 0,58	17,38 ± 8,50	10,09 ± 0,50
TOC	% s.t.	69,48 ± 0,41	70,73 ± 4,80	71,27 ± 2,12

Rezultati kemijskog sastava pogače lana nakon 10 dana obrade s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* razlikuju se najviše u udjelu suhe tvari, masti, te ekstraktibilnih šećera.

4.3.2. Promjena masenog udjela pojedinačnih šećera tijekom biološke obrade lanene pogače s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*

Vrijednosti masenih udjela pojedinačnih šećera (glukoza, fruktoza, saharoza, maltoza i maltotrioza) identificiranih u ekstraktima dobivenim kruto-tekućom ekstrakcijom neobrađenih i biološki obrađenih uzoraka pogače lana sa *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* prikazane su grafički (**Slike 11-15**). Biološka obrada je provedena tijekom deset dana fermentacija, a uzorci su uzimani svaki dan tijekom fermentacije.

Na **Slici 11** je prikazana ovisnost masenog udjela glukoze u ovisnosti o vremenu fermentacije prilikom biološke obrade pogače lana. U uzorku neobrađene pogače lana, te nakon prvog dana biološke obrade nije detektirana glukoza. Drugog dana biološke obrade pogače glukoza je identificirana i kvantificirana prilikom obrade pogače s oba mikroorganizma, pa je tako prilikom obrade s *Trametes versicolor* maseni udio glukoza iznosio 3,44 mg/g_{s.t.}, a prilikom obrade s *Humicola grisea* 1,38 mg/g_{s.t.}. Tijekom trećeg i četvrtog dana obrade s *Trametes versicolor* udio glukoze se kretao od 1,22 do 1,28 mg/g_{s.t.}, nakon čega od petog do desetog dana glukoza nije detektirana u uzorku, što bi značilo da je *Trametes versicolor* iskoristio glukožu za rast i razvoj. Kod obrade pogače lana s *Humicola grisea* također je vidljivo da mikroorganizam metabolizira glukožu, obzirom da maseni udio glukoze nastavlja opadati nakon drugog dana, te se u rasponu od četvrtog do desetog dana kreće od 0,13 do 0,44 mg/g_{s.t.}, sa udjelom od 0,25 mg/g_{s.t.} zadnjeg dana biološke obrade.

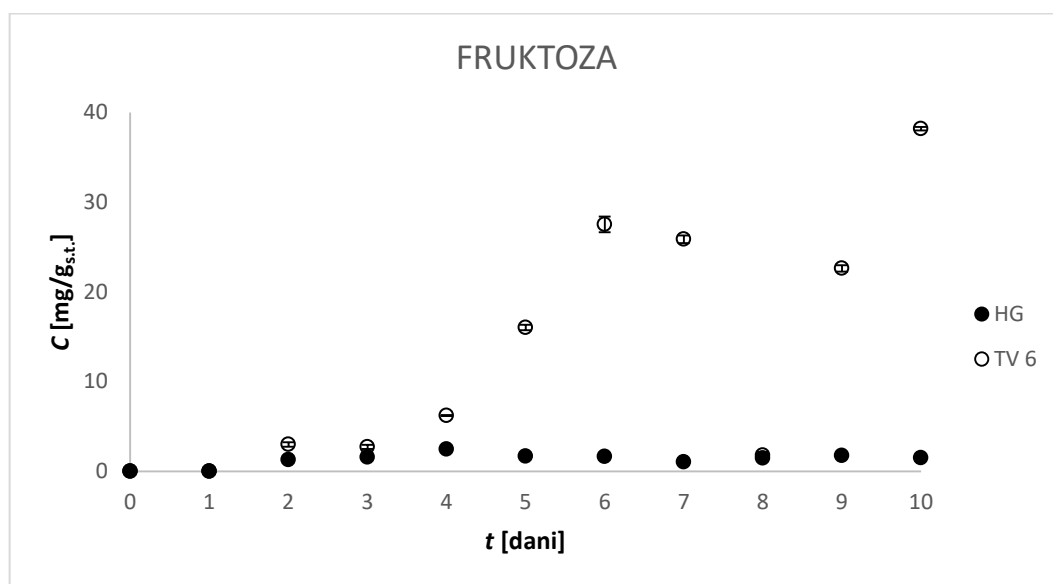


Slika 11 Maseni udio glukoze (C) u ekstraktima biološki obrađene pogače lana s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

Fruktoza nije prisutna u pogači lana prije obrade, kako je vidljivo u rezultatima prikazanim na **Slici 12**, te nije detektirana ni prvog dana obrade s oba mikroorganizma. Usporedbom obrade pogače s *Trametes versicolor* i obrade s *Humicola grisea*, može se zaključiti da *Trametes versicolor* metabolizira fruktozu u značajno manjoj mjeri, dok ona nastaje

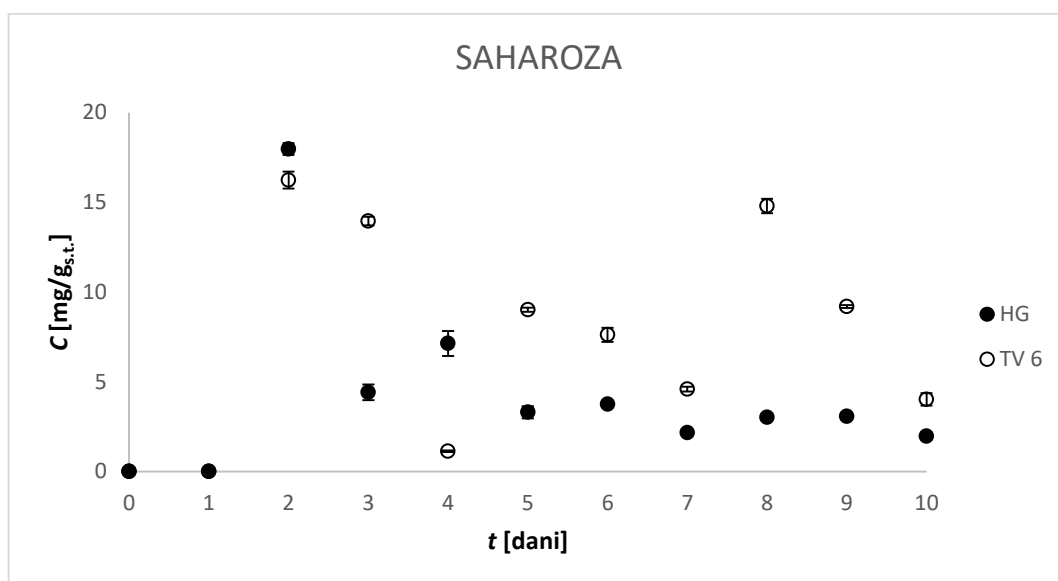
razgradnjom složenih ugljikohidrata, te tako maseni udio iste kontinuirano raste, pa nakon desetog dana obrade iznosi 38,21 mg/g_{s.t.}. S druge strane, maseni udio fruktoze je ujednačeniji tijekom obrade s *Humicola grisea*, te se kreće u rasponu od 1,04 do 2,49 mg/g_{s.t.}, sa završnom koncentracijom od 1,51 mg/g_{s.t.}.

Iz rezultata biološke obrade bučine pogače, te obrade pogače lana, vidljivo je da *Trametes versicolor* preferira glukozu u odnosu na fruktozu.



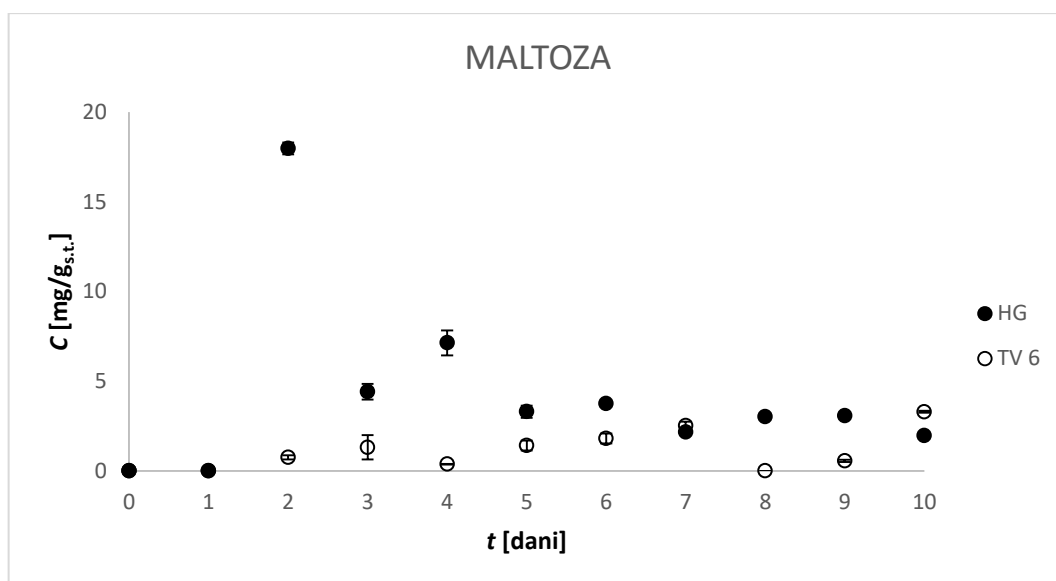
Slika 12 Maseni udio fruktoze (C) u ekstraktima biološki obrađene pogače lana s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

Iz rezultata prikazanih na **Slici 13** vidljivo je kako saharoza nije prisutna u neobrađenoj pogači lana, pa ni u uzorcima pogače obrađenoj s mikroorganizmima nakon prvog dana uzgoja. Drugog dana uzgoja izmjeren je porast masenog udjela saharoze od 16,24 mg/g_{s.t.} kod obrade pogače s *Trametes versicolor*, te udio od 17,97 mg/g_{s.t.} prilikom obrade s *Humicola grisea*. U narednim danima biološke obrade s *Trametes versicolor* maseni udio saharoze varira od 1,14 do 14,80 mg/g_{s.t.}, te je vidljivo da gljiva hidrolizira saharozu budući je maseni udio desetog dana 4,02 mg/g_{s.t.}. Prilikom obrade s *Humicola grisea* maseni udio saharoze je unutar raspona od 2,16 do 7,14 mg/g_{s.t.}, sa koncentracijom 1,97 mg/g_{s.t.} zadnjeg dana obrade. *Humicola grisea* u većoj mjeri metabolizira saharozu, u odnosu na obradu pogače s *Trametes versicolor*.



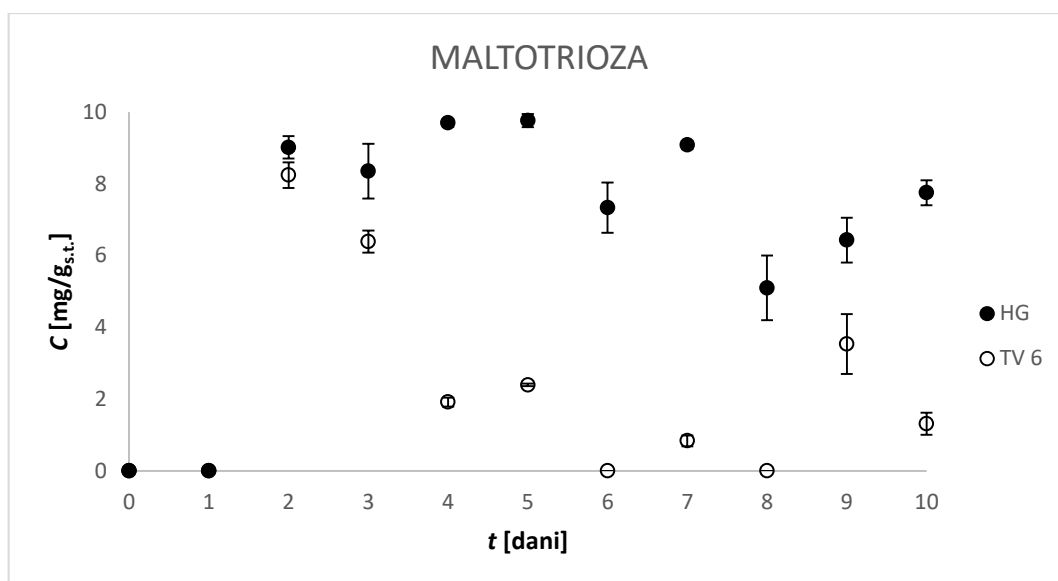
Slika 13 Maseni udio saharoze (C) u ekstraktima biološki obrađene pogače lana s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

U početnom neobrađenom uzorku pogače lana nije detektirana prisutnost maltoze, pa tako ni prvog dana biološke obrade. Na **Slici 14** vidljivo je kako drugog dana dolazi do porasta masenog udjela maltoze (17,97 mg/g_{s.t.}) u uzorku obrađivanom s *Humicola grisea*, koji zatim kontinuirano opada do posljednjeg dana obrade kada iznosi 1,97 mg/g_{s.t.}. Prilikom obrade pogače s *Trametes versicolor*, maseni udio maltoze od drugog dana obrade (0,76 mg/g_{s.t.}) raste sve do osmog dana, kada udio maltoze naglo opada, te nije bilo moguće izmjeriti koncentraciju. Nakon osmog dana udio maltoze opet raste, te je desetog dana izmjerena koncentracija od 3,30 mg/g_{s.t.}.



Slika 14 Maseni udio maltoze (C) u ekstraktima biološki obrađene pogače lana s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

Slika 15 prikazuje ovisnost masenog udjela maltotrioze u ovisnosti o vremenu fermentacije prilikom biološke obrade s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*. Iz rezultata je vidljivo kako maltotrioza nije prisutna u neobrađenom uzorku, a ni nakon prvog dana obrade s mikroorganizmima. Drugog dana su izmjereni podjednaki maseni udjeli maltotrioze prilikom obrade pogače s oba mikroorganizma, pa je tako u uzorku obrađenom s *Trametes versicolor* izmjeren udio od 8,25 mg/g_{s.t.}, a u uzorku obrađenom s *Humicola grisea* 9,02 mg/g_{s.t.}. Nakon obrade s *Trametes versicolor*, desetog dana u uzorku je udio maltoze 1,31 mg/g_{s.t.}, a nakon obrade s *Humicola grisea* 7,75 mg/g_{s.t.}. Može se zaključiti da oba mikroorganizma hidroliziraju maltotriozu, no u većoj je mjeri metabolizirana prilikom obrade lanene pogače s *Trametes versicolor*.



Slika 15 Maseni udio maltotrioze (C) u ekstraktima biološki obrađene pogače lana s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata, doneseni su sljedeći zaključci:

- ~ Bučina pogača korištena u ovom istraživanju sadrži $93,07 \pm 0,00$ % suhe tvari, $7,82 \pm 0,00$ % s.t. pepela, $38,27 \pm 0,56$ % s.t. ukupnih proteina, $5,71 \pm 0,18$ % s.t. ekstraktibilnih proteina, $36,55 \pm 0,00$ % s.t. masti, $2,64 \pm 0,46$ % s.t. ekstraktibilnih šećera, $73,47 \pm 0,62$ % s.t. TOC-a, te od vlakana $11,81 \pm 1,43$ % s.t. NDF-a, $5,12 \pm 1,77$ % s.t. ADF-a i $1,41 \pm 1,20$ % s.t. ADL-a.
- ~ Nakon desetog dana obrade bučine pogače s *Trametes versicolor* TV6 došlo je do povećanja udjela pepela i ukupnog organskog ugljika, te smanjenja udjela suhe tvari, ukupnih i ekstraktibilnih proteina, masti, vlakana (NDF, ADF, ADL), te ekstraktibilnih šećera. U slučaju obrade bučine pogače s *Humicola grisea* nakon desetog dana došlo je do povećanja udjela pepela, ukupnih proteina, ADL-a i ukupnog organskog ugljika, te smanjenja suhe tvari, ekstraktibilnih proteina, masti, NDF-a, ADF-a i ekstraktibilnih šećera.
- ~ Najveći udio ukupnih proteina ($41,91 \pm 0,25$ % s.t.) u bučinoj pogači određen je nakon desetog dana biološke obrade pomoću termofilne gljive *Humicola grisea*, dok je najmanji udio vlakana izmjeren u uzorku obrađenom s gljivom bijelog truljenja *Trametes versicolor*, odnosno udjeli su iznosili $3,34 \pm 0,19$ % s.t. za NDF, $1,25 \pm 0,03$ % s.t. za ADF, te $0,15 \pm 0,01$ s.t. za ADL.
- ~ Pogača lana korištena u ovom istraživanju sadrži $92,09 \pm 0,00$ % suhe tvari, $5,30 \pm 0,00$ % s.t. pepela, $33,26 \pm 0,00$ % s.t. ukupnih proteina, $5,03 \pm 0,19$ % s.t. ekstraktibilnih proteina, $21,75 \pm 0,00$ % s.t. masti, $2,02 \pm 0,58$ % s.t. ekstraktibilnih šećera, $69,48 \pm 0,41$ % s.t. TOC-a, te od vlakana $18,83 \pm 1,87$ % s.t. NDF-a, $14,22 \pm 0,30$ % s.t. ADF-a i $6,02 \pm 0,35$ % s.t. ADL-a.
- ~ Nakon desetog dana obrade pogače lana s *Trametes versicolor* TV6 došlo je do povećanja udjela pepela, ukupnih proteina, ekstraktibilnih šećera i ukupnog organskog ugljika, te smanjenja udjela suhe tvari, ekstraktibilnih proteina, masti i vlakana (NDF, ADF, ADL). U slučaju obrade pogače lana s *Humicola grisea* nakon desetog dana došlo je do povećanja udjela pepela, ukupnih proteina, ekstraktibilnih šećera i ukupnog organskog ugljika, te smanjenja suhe tvari, ekstraktibilnih proteina, masti i vlakana (NDF, ADF, ADL).

- ~ Najviši udio ukupnih proteina ($50,05 \pm 0,33$ % s.t.) u pogači lana određen je nakon desetog dana biološke obrade pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor*, dok je udio vlakana podjednako smanjen nakon obrade s oba mikroorganizma.
- ~ Prema rezultatima kemijske analize pogače buče i lana vidljivo je kako su iste vrlo vrijedan otpad, odnosno nusproizvod prehrambene industrije, zahvaljujući visokom sadržaju proteina, masti i vlakana, te kao takve mogu imati primjenu kao supstrati za proizvodnju visokovrijednih proizvoda ili kao dodatak ljudskoj prehrani, te kao stočna hrana. Biološka obrada s gljivama *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* utječe na nutritivnu vrijednost pogača, i to povećanjem probavljivosti i udjela proteina u pogačama.
- ~ Najzastupljeniji šećer u biološki neobrađenoj pogači buče bila je saharoza ($17,59$ mg/g_{s.t.}), nakon koje je slijedila fruktoza ($0,48$ mg/g_{s.t.}), te glukoza ($0,37$ mg/g_{s.t.}), dok masene udjele maltoze i maltotrioze nije bilo moguće odrediti.
- ~ Nakon desetog dana obrade bučine pogače s *Trametes versicolor* TV6 maseni udio glukoze nije bilo moguće odrediti, a maseni udio fruktoze iznosio je $20,09$ mg/g_{s.t.}, saharoze $3,73$ mg/g_{s.t.}, maltoze $2,91$ mg/g_{s.t.} i maltotrioze $2,77$ mg/g_{s.t.}
- ~ Nakon desetog dana obrade bučine pogače s *Humicola grisea* maseni udio glukoze iznosio je $1,37$ mg/g_{s.t.}, fruktoze $1,35$ mg/g_{s.t.}, saharoze $0,30$ mg/g_{s.t.}, maltoze $0,80$ mg/g_{s.t.}, dok maseni udio maltotrioze nije bilo moguće odrediti.
- ~ U neobrađenoj pogači lana nije bilo moguće odrediti masene udjele glukoze, fruktoze, saharoze, maltoze i maltotrioze.
- ~ Nakon desetog dana obrade pogače lana s *Trametes versicolor* TV6 maseni udio glukoze nije bilo moguće odrediti, a maseni udio fruktoze iznosio je $38,21$ mg/g_{s.t.}, saharoze $4,02$ mg/g_{s.t.}, maltoze $3,30$ mg/g_{s.t.} i maltotrioze $1,31$ mg/g_{s.t.}
- ~ Nakon desetog dana obrade pogače lana s *Humicola grisea* maseni udio glukoze iznosio je $0,25$ mg/g_{s.t.}, fruktoze $1,51$ mg/g_{s.t.}, saharoze $1,97$ mg/g_{s.t.}, maltoze $1,97$ mg/g_{s.t.} i maltotrioze $7,75$ mg/g_{s.t.}
- ~ Rezultati pokazuju da gljiva bijelog truljenja, *Trametes versicolor* TV6, i termofilna gljiva, *Humicola grisea*, imaju veliku sposobnost razgradnje polisaharida sekrecijom izvanstaničnih enzima u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, pri čemu se oslobađaju monosaharidi, disaharidi i oligosaharidi.

6. LITERATURA

- Akin G, Arslan FN, Karuk Elmas SN, Yilmaz I: Cold-pressed pumpkin seed (*Cucurbita pepo* L.) oils from the central Anatolia region of Turkey: Characterization of phytosterols, squalene, tocopherols, phenolic acids, carotenoids and fatty acid bioactive compounds. *Grasas y Aceites* 69: e232, 2018.
- Ali HKQ, Zulkali MMD: Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation: A Review. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 25:255-266, 2011.
- Allison DS, Rey MW, Berka RM, Armstrong G, Dunn-Coleman NS: Transformation of the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* and overproduction of *Humicola* glucoamylase. *Current Genetics* 21:225-229, 1992.
- Aust SD: Mechanisms of degradation by white rot fungi. *Environmental Health Perspectives* 103:59-61, 1995.
- Banerjee K, Thiagarajan P: *Linum usitatissimum* L. (Flax) plant and its seed oil a review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* 8:623-628, 2015.
- Bellon-Maurel V, Orliac O, Christen P: Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry* 38:881-896, 2003.
- Bhargava S, Panda BP, Ali M, Javed S: Solid-state Fermentation: An Overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 22:49-70, 2008.
- Blanchette RA: Delignification by wood-decay fungi. *Annual Review of Phytopathology* 29:381-398, 1991.
- Bochkarev MS, Egorova EY, Reznichenko IY, Poznyakovskiy VM: Reasons for the ways of using oilcakes in food industry. *Foods and Raw Materials* 4:4-12, 2016.
- Borràs E, Blánquez P, Sarrà M, Caminal G, Vicent T: *Trametes versicolor* pellets production: Low-cost medium and scale-up. *Biochemical Engineering Journal* 42:61-66, 2008.
- Bradford MM: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254, 1976.
- Campos L, Felix CR: Purification and Characterization of a Glucoamylase from *Humicola grisea*. *Applied and Environmental Microbiology* 61:2436-2438, 1995.

- Chen H: *Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice*. Springer Science & Business Media, Nizozemska, 2013.
- Couto SR, Sanromán MÁ: Application of solid-state fermentation to food industry – A review. *Journal of food engineering* 76:291-302, 2006.
- Cozea A, Ionescu N, Popescu M, Neagu M, Gruia R: Comparative Study Concerning the Composition of Certain Oil Cakes with Phytotherapeutical Potential. *Revista de Chimie* 67:422-425, 2016.
- Cui J, Chisti Y: Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances* 21:109-122, 2003.
- De Paula EH, Poças-Fonseca MJ, Azevedo MO: The product of *Humicola grisea* var. *thermoidea* *cbh1.2* gene is the major expressed protein under induction by lignocellulosic residues. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19:631-635, 2003.
- Gadd GM: *Fungi in Bioremediation*. British Mycological Society, New York, SAD, 2001.
- Gadd GM, Watkinson SC, Dyer PS: *Fungi in the Environment*. Cambridge University Press, New York, SAD, 2007.
- Gutiérrez C, Rubilar M, Jara C, Verdugo M, Sineiro J, Shene C: Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10:454-463, 2010.
- Halle I, Schöne F: Influence of rapeseed cake, linseed cake and hemp seed cake on laying performance of hens and fatty acid composition of egg yolk. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* DOI 10.1007/s00003-013-0822-3, 2013.
- Hesseltine CW: Solid State Fermentation-An Overview. *International Biodeterioration* 23:79-89, 1987.
- Isroi, Millati R, Syamsiah S, Niklasson C, Cahyanto MN, Lundquist K, Taherzadeh MJ: Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. *BioResources* 6:5224-5259, 2011.
- Jeon IJ, Ikins WG: *Analyzing Food for Nutrition Labeling and Hazardous Contaminants*. Marcel Dekker Inc., New York, SAD, 1995.

- Jones DB: Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. *Circular* 183:1-22, 1931.
- Krimer Malešević V: Fenolni potencijal uljanih pogača. *Doktorska disertacija*. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2016.
- Magan N: Ecophysiology: Impact of Environment on Growth, Synthesis of Compatible Solutes and Enzyme Production. U *British Mycological Society Symposia*, str. 63-78. Elsevier, 2008.
- Mahajan S: Characterization of the white-rot fungus, *Phanerochaete carnos*, through proteomic methods and compositional analysis of decayed wood fibre. *Doktorska disertacija*. Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Toronto, 2011.
- Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK: Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:461-488, 2000.
- Mello-de-Sousa TM, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ: Carbon source and pH-dependent transcriptional regulation of cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology* 48:19-26, 2011.
- Mirabella N, Castellani V, Sala S: Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production* 65:28-41, 2014.
- Mitchell DA, Berović M, Krieger N: Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 68:61-138, 2000.
- Mitchell DA, Berović M, Krieger N: Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review* 8:183-225, 2002.
- Mitchell DA, Krieger N, Berović M: *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*. Springer Science & Business Media, Njemačka, 2006.
- Möller J: *Comparing methods for fibre determination in food and feed*. Dedicated Analytical Solutions, FOSS, 2014.
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA: Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. U *Industrial Waste*, str. 121-140. InTech, Rijeka, Hrvatska, 2012.

- Ogunronbi O, Jooste PJ, Abu JO, Van der Merwe B: Chemical composition, storage stability and effect of cold-pressed flaxseed oil cake inclusion on bread quality. *Journal of Food Processing and Preservation* 35:64-79, 2011.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P: Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77:149-162, 1999.
- Pandey A, Soccol CR, Mitchell D: New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35:1153-1169, 2000.
- Pandey A: Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13:81-84, 2003.
- Peričin D, Mađarev-Popović S, Radulović-Popović Lj, Škrinjar M: Evaluate of pumpkin oil cake as substrate for the cellulase production by *Penicillium roqueforti* in solid state fermentation. *Roumanian Biotechnological Letters* 13:3815-3820, 2008.
- Poças-Fonseca MJ, Lima BD, Brigido MM, Silva-Pereira I, Felipe MSS, Radford A, Azevedo MO: *Humicola grisea* var. *thermoidea* cbh1.2: A new gene in the family of cellobiohydrolases is expressed and encodes a cellulose-binding domain-less enzyme. *Journal of General and Applied Microbiology* 43:115-120, 1997.
- Poças-Fonseca MJ, Silva-Pereira I, Rocha BB, Azevedo MO: Substrate-dependent differential expression of *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase genes. *Canadian Journal of Microbiology* 46:749-752, 2000.
- Poças-Fonseca MJ, Matos RWM, Mello-de-Sousa TM: The Lignocellulolytic System of Thermophilic Fungi and Actinomycetes: Structure, Regulation, and Biotechnological Applications. U *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles*, str. 731-769, Springer Science & Business Media, Dordrecht, Nizozemska, 2013.
- Pojić M, Mišan A, Sakač M, Dapčević-Hadnađev T, Šarić B, Milovanović I, Hadnađev M: Characterization of Byproducts Originating from Hemp Oil Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:12436-12442, 2014.
- Radočaj O, Dimić E, Vujasinović V: Development of a Hull-Less Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Oil Press-Cake Spread. *Journal of Food Science* 00:C1-C7, 2012.

- Rahardjo YSP: Fungal Mats in Solid-State Fermentation. *Doktorska disertacija*. Wageningen University, Department of Agrotechnology and Food Sciences, Nizozemska, 2005.
- Ramachandran S, Singh SK, Larroche C, Soccol CR, Pandey A: Oil cakes and their biotechnological applications – A review. *Bioresource Technology* 98:2000-2009, 2007.
- Salihu A, Alam MZ, AbdulKarim MI, Salleh HM: Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling* 58:36-44, 2012.
- Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, Lesage-Meessen L, Levasseur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E: Fungal Strategies for Lignin Degradation. *Advances in Botanical Research* 61:263-308, 2012.
- Singh H: *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*. John Wiley & Sons Inc., New Jersey, SAD, 2006.
- Singh KK, Mridula D, Rehal J, Barnwal P: Flaxseed: A Potential Source of Food, Feed and Fiber. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51:210-222, 2011.
- Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A: Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44:13-18, 2009.
- Straatsma G, Samson RA: Taxonomy of *Scytalidium thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost. *Mycological Research* 97:321-328, 1993.
- Tamer CE, Çopur ÖU: Development of value-added products from food wastes. U *Food Processing: Strategies for Quality Assessment*, str. 453-475, Springer Science & Business Media, New York, SAD, 2014.
- Teh SS, Birch J: Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis* 30:26-31, 2013.
- Thomas L, Larroche C, Pandey A: Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 81:146-161, 2013.
- Tišma M, Tadić T, Budžaki S, Ostojčić M, Šalić A, Zelić B, Tran NN, Ngothai Y, Hessel V: Lipase production by solid-state cultivation of *Thermomyces lanuginosus* on by-products from cold-pressing oil production. *Processes* 7, 2019.

- Tosi LRO, Terenzi HF, Jorge JA: Purification and characterization of an extracellular glucoamylase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Canadian Journal of Microbiology* 39:846-852, 1993.
- Trudell S, Ammirati J: *Mushrooms of the Pacific Northwest*. Timber Press inc., Kina, 2009.
- Vassilev N, Vassileva M: Production of organic acids by immobilized filamentous fungi. *Mycological Research* 96:563-570, 1992.
- Vukša V, Dimić E, Dimić V: Characteristics of cold pressed pumpkin seed oil. U *Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier*, str. 493-496. Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Jena/Thüringen, 2003.
- Webster J, Weber RWS: *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, New York, SAD, 2007.
- Xavier AMRB, Tavares APM, Ferreira R, Amado F: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Journal of Biotechnology* 10:444-451, 2007.
- Yağci S, Göğüş F: Effect of incorporation of various food by-products on some nutritional properties of rice-based extruded foods. *Food Science and Technology International* 15:571-581, 2009.
- Zdunczyk Z, Minakowski D, Frejnagel S, Flis M: Comparative study of the chemical composition and nutritional value of pumpkin seed cake, soybean meal and casein. *Nahrung-Food* 43:392-395, 1999.