

Profil polifenolnih spojeva tijekom proizvodnje lignolitičkih enzima uzgojem *Trametes versicolor* na pivskom tropu

Popijač, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:406627>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**

REPOZITORIJ

PTFS

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

Ana Popijač

PROFIL POLIFENOLNIH SPOJEVA TIJEKOM PROIZVODNJE
LIGNOLITIČKIH ENZIMA UZGOJEM *TRAMETES VERSICOLOR* NA
PIVSKOM TROPU

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj
Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Kemijski i biokemijski reaktori**Tema rada** je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 17. srpnja 2023.**Mentor:** prof. dr. sc. *Marina Tišma***Pomoć pri izradi:** *Anđela Matić*, mag.ing.proc.**Profil polifenolnih spojeva tijekom proizvodnje lignolitičkih enzima uzgojem *Trametes versicolor* na pivskom tropu***Ana Popijač*, 0113145290**Sažetak:**

U ovom radu pivski trop je korišten kao supstrat za uzgoj *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Tijekom rasta mikroorganizma, mjerene su aktivnosti lignolitičkih enzima (lakaze, mangan peroksidaze i lignin peroksidaze), koncentracija ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina te koncentracija pojedinačnih polifenolnih spojeva. Fermentacija na čvrstim nosačima provedena je pri sljedećim početnim procesnim uvjetima: $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 15$ dana, m (supstrata) = 30 g, udio vlage = 64,65 %. Gubitak na masi materijala nakon 15 dana fermentacije iznosio je 25,33 %, a pH supstrata bio je u rasponu od 6,14 do 6,82. Najveća volumna aktivnost lakaze postignuta je nakon 8. dana i iznosila je 141,7 U/L. Najveća volumna aktivnost mangan peroksidaze postignuta je nakon 11. dana fermentacije i iznosila je 153,3 U/L. Tijekom fermentacije nije zabilježena proizvodnja enzima lignin peroksidaze. Najveće koncentracije ukupnih flavonoida, proantocijanidina i polifenola postignute su nakon 13. dana fermentacije i iznosile su 1,8293 mg/g s.t. za flavonoide, 0,2373 mg/g s.t. za proantocijanidine i 12,4945 mg/g s.t. za polifenole. U početnom uzorku pivskog tropa detektirana su 2 polifenolna spoja (engeletin i miricetin), a na kraju fermentacije 3 polifenolna spoja (siringinska kiselina, kumarinska kiselina i epikatehin) od ukupno testiranih 5.

Ključne riječi: Pivski trop, *Trametes versicolor*, fermentacija na čvrstim nosačima, lignolitički enzimi, polifenolni spojevi**Rad sadrži:** 48 stranica
18 slika
4 tablice
58 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- | | |
|---------------------------------------------------|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Mirela Planinić</i> | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. <i>Marina Tišma</i> | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. <i>Ana Bucić-Kojić</i> | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Kristina Mastanjević</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 29. rujna 2023.

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 Energy, Environment and Sustainable Development
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Chemical and biochemical reactors

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X. held on July 17, 2023.

Mentor: *Marina Tišma*, Full prof.

Technical assistance: *Anđela Matić*, mag.ing.proc.

Profile of Polyphenolic Compounds During the Production of Lignolytic Enzymes by Cultivation of *Trametes versicolor* on Brewer's Spent Grain

Ana Popijač, 0113145290

Summary:

In this work, brewer's spent grain was used as a substrate for the cultivation of *Trametes versicolor* under solid state fermentation conditions. During the growth of microorganisms, the activities of lignolytic enzymes (laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase), the concentration of total polyphenols, flavonoids and proanthocyanidins and the concentration of individual polyphenolic compounds were measured. Solid state fermentation was performed under the following initial process conditions: $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 15\text{ days}$, m (substrate) = 30 g, moisture content = 64.65 %. The mass loss of the material after 15 days of fermentation was 25.33%, and the pH of the substrate ranged from 6.14 to 6.82. The highest volume activity of laccase was reached after the 8th day of fermentation and was 141.7 U/L. The highest volume activity of manganese peroxidase was reached after the 11th day of fermentation and was 153.3 U/L. No production of lignin peroxidase enzyme was detected during fermentation. The highest concentrations of total flavonoids, proanthocyanidins and polyphenols were reached after the 13th day of fermentation and were 1.8293 mg/g d.w., 0.2373 mg/g d.w and 12.4945 mg/g d.w. for flavonoids, proanthocyanidins and polyphenols, respectively. In the initial sample of brewer's spent grain, 2 polyphenolic compounds (engeletin and myricetin) were detected, while at the end of fermentation 3 polyphenolic compounds (syringic acid, *t*-coumaric acid and epicatechin) were detected out of 5 tested polyphenolic compounds.

Key words: Brewer's spent grain, *Trametes versicolor*, solid-state fermentation, lignolytic enzymes, polyphenolic compounds

Thesis contains: 48 pages
18 figures
4 tables
58 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--------------------------------------------------|--------------|
| 1. <i>Mirela Plininić</i> , full prof. | chair person |
| 2. <i>Marina Tišma</i> , full prof. | supervisor |
| 3. <i>Ana Bucić-Kojić</i> , full prof. | member |
| 4. <i>Kristina Mastanjević</i> , associate prof. | stand-in |

Defense date: September 29, 2023

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

Zahvaljujem se mojoj mentorici prof.dr.sc Marini Tišmi na uloženom vremenu, trudu i brojnim savjetima tijekom pisanja diplomskog rada.

Asistentici Anđeli Matić zahvaljujem na strpljenju i pomoći tijekom brojnih sati provedenih u laboratoriju.

Najveće hvala mami, tati i seki koji su uvijek bili tu za mene i pružali mi neizmjernu podršku. Baki i djedu koji su se najviše radovali svakom mom položenom ispitu. Prabaki, baki i didi koji su s neba nastavili pratiti svaki moj korak. Najboljim prijateljima na svijetu koji su me uvijek gurali naprijed i nikada mi nisu dali da posustanem. Hvala vam svima što ste bili uz mene kroz ovo putovanje, jer bez vas ovo ne bih uspjela.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. FERMENTACIJA NA ČVRSTIM NOSAČIMA	4
2.2. PIVSKI TROP	6
2.2.1. Polifenolni spojevi u pivskom tropu	9
2.3. GLJIVE BIJELOG TRULJENJA	9
2.3.1. <i>Trametes versicolor</i>	11
2.4. LIGNOLITIČKI ENZIMI	12
2.4.1. Lakaza	12
2.4.2. Mangan peroksidaza.....	13
2.4.3. Lignin peroksidaza	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. ZADATAK	16
3.2. MATERIJALI	16
3.2.1. Supstrat i mikroorganizam.....	16
3.2.2. Kemikalije	17
3.2.3. Priprema otopina	17
3.3. METODE	19
3.3.1. Fermentacija na čvrstim nosačima	19
3.3.2. Gubitak na masi supstrata i određivanje pH vrijednosti supstrata.....	21
3.3.3. Udio suhe tvari.....	22
3.3.4. Ekstrakcija enzima	23
3.3.5. Mjerenje aktivnosti enzima	24
3.3.6. Određivanje koncentracije polifenolnih spojeva.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. UZGOJ <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> NA PIVSKOM TROPU U UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA	30

4.2. PROIZVODNJA LIGNOLITIČKIH ENZIMA UZGOJEM <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> NA PIVSKOM TROPU U UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA.....	31
4.2.1. Proizvodnja enzima lakaze uzgojem <i>Trametes versicolor</i> na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima	31
4.2.2. Proizvodnja enzima mangan peroksidaze uzgojem <i>Trametes versicolor</i> na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima	33
4.2.3. Proizvodnja enzima lignin peroksidaze uzgojem <i>Trametes versicolor</i> na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima	34
4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE POLIFENOLNIH SPOJEVA TIJEKOM PROIZVODNJE LIGNOLITIČKIH ENZIMA UZGOJEM <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> NA PIVSKOM TROPU U UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA	35
4.3.1. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida, proantocijanidina i polifenola	35
4.3.2. Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva	37
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	43

Popis oznaka, kratica i simbola

OZNAKE:

d	promjer kivete [cm]
Da	unificirana jedinica mase atoma [$1,6605 \cdot 10^{-27}$ kg]
rcf	relativna centrifugalna sila [$1rcf=1g$, $g=9,81 \text{ m/s}^2$]
dA/dt	promjena apsorbancije u vremenu [1/min]

KRATICE:

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
LiP	lignin peroksidaza
MnP	mangan peroksidaza
S.A.	specifična aktivnost enzima [U/mg]
SmF	eng. Submerged fermentation, submerzna fermentacija
SSF	eng. solid-state fermentation, fermentacija na čvrstim nosačima
U	međunarodna jedinica enzimске aktivnosti [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
V.A.	volumna aktivnost enzima [U/mL]

SIMBOLI:

λ	valna duljina [nm]
γ	masena koncentracija tvari [g/L]
ε	ekstinkcijski koeficijent [$\text{dm}^3/\mu\text{molcm}$]

1. UVOD

Pivski trop najzastupljeniji je nusproizvod pivarske industrije. Čini čak 85 % svih nusproizvoda u proizvodnji piva. Po kemijskom sastavu pivski trop je lignocelulozni materijal sastavljen od hemiceluloze, celuloze, lignina te proteina, lipida, vitamina, minerala i polifenolnih spojeva. Nastaje u velikim količinama na globalnoj razini tijekom cijele godine, jeftin je i može se primjenjivati u brojnim biotehnološkim procesima (Pejin i sur., 2013; Zeko-Pivač i sur., 2022).

Fermentacija na čvrstim nosačima proces je koji se odvija na čvrstim supstratima u djelomičnoj ili potpunoj odsutnosti slobodne vode. Ovaj način uzgoja najviše odgovara filamentoznim gljivama, kao što su primjerice gljive bijelog truljenja, budući da se oponašaju uvjeti njihovog prirodnog staništa. U ovim uvjetima sposobne su sintetizirati znatne količine industrijski važnih enzima, kao što su lakaze, lignin peroksidaze i mangan peroksidaze (Pandey, 2003; Soccol i sur., 2017; Obi, 2019).

U ovom radu je gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* uzgajana na pivskom tropu kao supstratu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. U radu je mjerena aktivnost lakaze, mangan peroksidaze i lignin peroksidaze, te je analiziran profil pojedinačnih polifenolnih spojeva te koncentracija ukupnih polifenola, flavonoida i proantocijanidina .

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FERMENTACIJA NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Fermentacija na čvrstim nosačima (eng. „solid-state fermentation“, SSF) proces je koji se odvija na čvrstim supstratima u djelomičnoj ili potpunoj odsutnosti slobodne vode. Potrebna vlaga za rast mikroorganizama prisutna je u apsorbiranom stanju ili u kompleksu unutar čvrstog matriksa. Čvrsti nosači mogu biti lignocelulozni supstrati koji služe kao izvor ugljika i drugih hranjivih tvari ili neki inertni materijali koji služe kao nosači za rast mikroorganizama (Krishna i sur., 2005; Thomas i sur., 2013; Lizardi-Jiménez i sur., 2017).

Prilikom razvoja SSF procesa treba voditi računa o nekoliko faktora. To uključuje odabir prikladnog mikroorganizma i supstrata, optimizaciju procesnih parametara te izolaciju i pročišćavanje proizvoda. Mikroorganizmi pogodni za uzgoj na lignoceluloznim materijalima su filamentozne gljive, kvasci i neke vrste bakterija. Ovaj način uzgoja najviše odgovara filamentoznim gljivama, budući da oponaša uvjete njihova prirodnog rasta. U ovim uvjetima filamentozne gljive sposobne su sintetizirati industrijski važne enzime i druge metabolite. Kvasci se najčešće koriste u procesima proizvodnje etanola, dok se bakterije uglavnom koriste za kompostiranje i siliranje (Pandey, 2003; Soccol i sur., 2017; Obi, 2019).

Micelij filamentoznih gljiva raste na način da se grana tvoreći mrežu hifa koje mogu prodirati u prostore između čestica. Ovaj način rasta omogućava gljivama veću površinu za korištenje hranjivih tvari. Nakon SSF procesa sve lignocelulozne komponente su reducirane. Također dolazi do smanjenja početne suhe tvari (Cooray i sur., 2018; Sousa i sur., 2018; Marcus i sur., 2021).

Najčešće korišteni lignocelulozni supstrati su poljoprivredni i šumski ostatci. Prema kemijskom sastavu, ovi materijali su građeni od celuloze, hemiceluloze, lignina, škroba, pektina i drugih vlakna. Mikroorganizam ih koristi kao izvor hranjivih tvari, no ponekad je potrebno dodavati suplemente (Soccol i sur., 2017).

Kako bi supstrat bio pogodan za proizvodnju visokovrijednih produkata i/ili biogoriva, potrebno ga je prethodno obraditi jednom ili više metoda predobrade, kao što su:

- usitnjavanje (mljevenje i ostali postupci koji dovode do smanjenja veličine čestica supstrata),
- fizikalne, kemijske ili enzimske metode predobrade s ciljem povećanja dostupnosti hranjivih tvari,

- suplementacija hranjivim tvarima te podešavanje pH i udjela vlage,
- uklanjanje kontaminanata pri visokim temperaturama (Obi, 2019).

Glavni koraci u provođenju SSF procesa su:

- Priprema inokuluma. Cilj ovog koraka je proizvodnja dovoljne količine i koncentracije inokuluma visoke mikrobiološke aktivnosti.
- Priprema supstrata.
- Priprema bioreaktora (čišćenje i sterilizacija).
- Inokulacija i punjenje bioreaktora. Inokulacija se provodi prije ili nakon punjenja bioreaktora, ovisno o mogućnostima miješanja supstrata. Ako se supstrat ne može miješati unutar bioreaktora, inokulacija se provodi izvan bioreaktora. U suprotnom se provodi unutar bioreaktora.
- Upravljanje procesom. Potrebno je regulirati procesne varijable kao što su primjerice protok i temperatura ulaznog zraka, temperatura rashladne vode te brzina miješanja (kod procesa s miješanjem). Ključni parametri fermentacije na čvrstim nosačima su vlažnost i temperatura čvrstih supstrata. Oni moraju biti optimalni kako bi mikroorganizam mogao rasti.
- Izolacija i pročišćavanje produkata.
- Zbrinjavanje otpadnih procesnih struja (Mitchell i sur., 2006).

Osim fermentaciju na čvrstim nosačima, lignocelulozni materijali kao supstrati se mogu koristiti i u klasičnoj submerznoj fermentaciji. Neke razlike između submerzne fermentacije i fermentacije na čvrstim nosačima prikazane su u **Tablici 1**. Submerzna fermentacija (eng. „submerged fermentation“, SmF) proces je u kojemu mikroorganizmi rastu u tekućem mediju s visokim sadržajem slobodne vode, za razliku od SSF. Zbog homogenosti, ovaj proces ima prednost u jednostavnijem praćenju i kontroli pH, koncentracije otopljenog kisika, temperature, miješanju i aeraciji te u lakšem odvajanju biomase nakon fermentacije. SSF proces manje je osjetljiv na kontaminaciju osobito bakterijama, omogućava veću produktivnost i manje je osjetljiv na inhibiciju supstrata što sve omogućava proizvodnju željenog proizvoda u većoj koncentraciji. Ekološki je prihvatljiviji zato što kao supstrat koristi

kruti agroindustrijski otpad, nastaje manje otpadne vode, niži su kapitalni i operativni troškovi (Soccol i sur., 2017).

Tablica 1 Usporedba SmF i SSF (Obi, 2019).

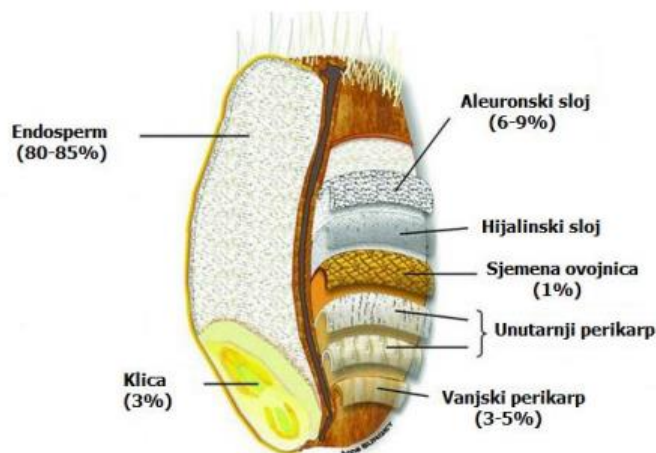
Karakteristike sustava	SmF	SSF
SUPSTRAT	Kompleksna hranjiva podloga koja sadrži u vodi topljivi supstrati (šećeri)	Polimerni u vodi netopljivi lignocelulozni materijali
STERILNOST	Jednostavna kontrola sterilnosti	Teška kontrola sterilnosti
VODA	Velika potrošnja vode i velika količina otpadne vode	Smanjena potrošnja vode, manje količine otpadnih voda
KONTROLA TEMPERATURE	Jednostavno kontroliranje temperature	Teško kontroliranje temperature
AERACIJA	Jednostavno održavanje potrebne koncentracije otopljenog kisika	Otežana kontrola aeracije
KONTROLA pH	Jednostavna kontrola pH	Nemogućnost direktnog mjerenja pH
MIJEŠANJE	Dobra homogenizacija	Otežano zbog heterogenosti sustava
UVEĆANJE PROCESA	Dostupna industrijska oprema	Nedostatak industrijske opreme - potreba za razvojem nove
KONTAMINACIJA	Manji rizik od kontaminacije	Veći rizik od kontaminacije
POTROŠNJA ENERGIJE	Velika potrošnja energije	Manja potrošnja energije

SSF danas nalazi veliku primjenu u raznim industrijama kao što su prehrambena, farmaceutska, tekstilna i biotehnološka. Koristi se u proizvodnji enzima, antibiotika, bioaktivnih spojeva, organskih kiselina, bioetanola i biodizela (Lizardi-Jiménez i sur., 2017; Soccol i sur., 2017).

2.2. PIVSKI TROP

Sirovine koje se koriste u proizvodnji piva su voda, ječam, hmelj i pivski kvasac. Zrno ječma (**Slika 1**) sastoji se od tri glavne komponente: klice, endosperma i ljuske. Iz ječma se proizvodi slad procesom slađenja. Slađenje obuhvaća močenje i klijanje zrna ječma te sušenje iskljalih zrna ječma. Takav slad koristi se za proizvodnju sladovine u pivovarama. Najznačajniji korak

pri proizvodnji sladovine je komljenje. U ovom koraku dolazi do miješanja usitnjenog slada i vode. Miješanjem i kuhanjem usitnjenog slada i vode nastaje komina. Komina predstavlja smjesu otopljenih i nerazgrađenih sastojaka slada u vodi. Vodena otopina ekstrahiranih sastojaka čini sladovinu, dok u vodi netopljivi sastojci čine pivski trop. Pivski trop čine pljevica, klica i drugi sastojci zrna slada koji se ne otapaju prilikom komljenja. Postupak odvajanja pivskog tropa od sladovine naziva se cijedenje (Pejin i sur., 2013).



Slika 1 Struktura zrna ječma (Antolić, 2017)

Sladovina je otopina bogata šećerima. Prilikom kuhanja sladovine dolazi do pretvaranja sladnog škroba u fermentirajuće (maltoza i maltotrioza) i nefermentirajuće (dekstrini) šećere. Proteini se također djelomično razgrađuju tijekom ove faze do polipeptida i aminokiselina (Mussatto, 2014).

Glavne komponente tropa su hemiceluloza, lignin i celuloza. Celuloza je homopolisaharid velike molekulske mase sastavljen od velikog broja jedinica celobioze. Hemiceluloza je razgranati heteropolisaharid sastavljen najčešće od pet monosaharida (L-arabinoza, D-galaktoza, D-manoza, D-glukoza i D-ksiloza). Lignin je složena molekula sastavljena od jedinica fenilpropana povezanih u veliku trodimenzionalnu strukturu. Lignin je zbog svoje molekulske konfiguracije otporan na kemijsku i enzimsku razgradnju. Proteini tropa su porijeklom iz aleuronskog sloja ječma i čine ih globulin, albumin, glutelin i hordein. Najzastupljeniji monosaharidi u tropu su ksiloza, glukoza i arabinoza (Pejin i sur., 2013).

Kemijski sastav pivskog tropa (**Tablica 2**) ovisi o vrsti ječma, vremenu i tehnici berbe, kakvoći slada i aditivima koji se dodaju prilikom kuhanja sladovine. Također ovisi i o uvjetima

skladištenja. Bogat je i fenolnim spojevima. Njihova koncentracija ovisi o genotipu korištenog slada i okolišu u kojem je slad uzgojen, te njihovoj interakciji tijekom procesa proizvodnje (Zeko-Pivač i sur., 2022).

Tablica 2 Kemijski sastav pivskog tropa

Komponenta	Pivski trop ^a (g/kg suhe tvari)	Pivski trop ^b (g/kg suhe tvari)	Pivski trop ^c (g/kg suhe tvari)
Celuloza	168	254	219
Hemiceluloza	284	218	296
Ksilan	199	NO	206
Arabinan	85	NO	90
Lignin	278	119	217
Proteini	153	240	246
Pepeo	46	24	12

^a Mussatto i sur. (2006)

^b Kanauchi i sur. (2001)

^c Carvalho i sur. (2004)

NO – nije određeno

Pivski trop se tradicionalno upotrebljava za proizvodnju hrane i stočne hrane. Pogodan je za proizvodnju stočne hrane zato što sadržava velike količine vlakana i proteina. U novije vrijeme koristi se u proizvodnji bioenergije, najčešće bioplina. Prepreke za njegovu širu primjenu su troškovi transporta i sušenja te potreba za predtretmanom (Zeko-Pivač i sur., 2022).

Može se koristiti kao dodatak proizvodima namijenjenima za ljudsku prehranu, te kao sirovina u biotehnologiji, u proizvodnji građevinskog materijala, papira, energije ili kao adsorbens (Pejin i sur., 2013).

2.2.1. Polifenolni spojevi u pivskom tropu

Fenolni spojevi bioaktivne su tvari široko rasprostranjene u biljkama. Posjeduju antioksidativna, antialergijska, protuupalna i antimikrobna svojstva. Zrno ječma odličan je izvor fenolnih spojeva kao što su fenolne kiseline, flavonoidi, tanini, proantocijanidini, i aminofenolni spojevi. U zrnu se mogu pronaći kao netopljivi vezani oblici, topljivi konjugirani i slobodni oblici. U pivskom tropu najzastupljenije su ferulinska kiselina i *p*-kumarinska kiselina (**Tablica 3**) (Menses i sur., 2013; Iadecola i sur., 2022).

Istraživanja pokazuju da koncentracija *p*-kumarinske kiseline u pivskom tropu može iznositi od 565 do 794 µg/g, a ferulinske od 1860 do 1948 µg/g. Većina bioaktivnih fenolnih kiselina prisutna je u vezanom obliku u pivskom tropu. Sadržaj polifenola u pivskom tropu najviše ovisi o vrsti slada koji je korišten prilikom proizvodnje (Ikram i sur., 2017).

Tablica 3 Koncentracija polifenolnih kiselina prisutnih u pivskom tropu izraženih kao mg na 100 g suhe tvari pivskog tropa (Ikram i sur., 2017).

FENOLNI SPOJ	c [mg/100 g s.t.]
Ferulinska kiselina	336,3 ± 16
<i>p</i> -kumarinska kiselina	64,4 ± 4,6
Sinapinska kiselina	42 ± 1,1
Kafeinska kiselina	9,9 ± 0,7
Siringična kiselina	6,5 ± 0,1

2.3. GLJIVE BIJELOG TRULJENJA

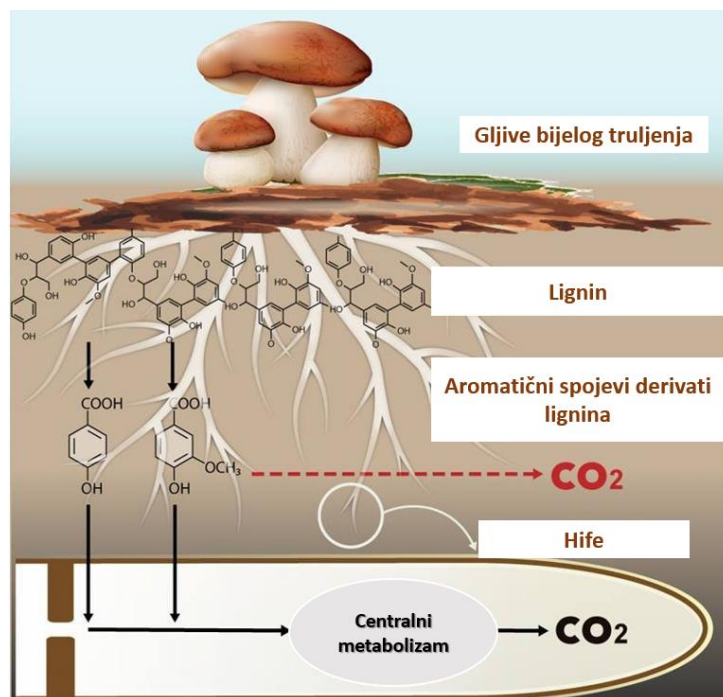
Gljive se na osnovu tipa spora, morfologije hifa i spolnog ciklusa mogu podijeliti u pet taksonomskih skupina: *Deuteromycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* i *Oomycetes*. Razred Basidiomycota sadrži gljive nazvane *Basidiomycetes*, koje su poznate kao

gljive klobučarke. Većina ovih gljiva su saprofiti te razgrađuju biljni materijal, posebno celulozu i lignin. U ovu skupinu pripadaju gljive bijelog truljenja (Šelo, 2014).

Bjerkandera, *Dichomitus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus* i *Trametes* poznati su rodovi ove skupine, a sve pripadaju gljivama bijelog truljenja. Tipični predstavnici su *Coriolopsis polyzona*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma viridae*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Polyporus versicolor* i *Coriolopsis galleca*. *Trametes* sp. najviše su proučavani članovi ove skupine. Gljive bijelog truljenja koriste dio svoje metaboličke energije u proizvodnji izvanstaničnih lignocelulitičkih enzima koji uzrokuju nastanak bijelog obojenja celuloznih i hemiceluloznih ostataka drveta nakon uklanjanja lignina. Po tome je ova skupina gljiva i dobila ime (Voběrková i sur., 2018).

Gljive bijelog truljenja mogu potpuno mineralizirati lignin i veliki broj aromatskih spojeva (**Slika 2**). Razgradnja ovih spojeva posljedica je katalitičkog djelovanja lakaze, lignin peroksidaze i mangan peroksidaze. Ovo su tri ključna enzima koji spadaju u enzimski sustav razgradnje lignina (Han i sur., 2005).

Glavna karakteristika gljiva bijelog truljenja koja ih razlikuje od ostalih mikroorganizama je njihova sposobnost da mineraliziraju sve komponente lignina do ugljikovog dioksida i vode. Biotehnološka primjena gljiva bijelog truljenja uključuje razgradnju industrijskih zagađivača i drugih opasnih materijala te proizvodnju lignolitičkih enzima (Tišma i sur., 2010).



Slika 2 Proces razgradnje lignina pomoću gljiva bijelog truljenja (del Cerro i sur., 2021).

2.3.1. *Trametes versicolor*

T. versicolor (Slika 3) poznata kao *Coriolus versicolor* ili *Polyporus versicolor*, tradicionalna je ljekovita gljiva koja raste na deblima drveća. Sadrži polisaharopeptid, proteine, aminokiseline i druge bioaktivne tvari (Dou i sur., 2019).



Slika 3 *Trametes versicolor* (Dou i sur., 2019)

T. versicolor pripada razredu *Basidiomycota* carstva gljiva. Kolokvijalno se naziva puranov rep, zbog svog oblika i raznih boja. Može se koristiti kao biomasa ili u obliku ekstrakta. Najpoznatiji

komercijalni pripravci *T. versicolor* su polisaharopeptid krestin (PKP) i polisaharopeptid (PSP). Oba se dobivaju iz micelija *T. versicolor* submerznim uzgojem. Fiziološke aktivnosti su im slične, no razlikuju se po strukturi. U prirodi se može pronaći na rodovima tvrdog drveća (hrast, prunus) i nekih četinjača (jela, bor). *T. versicolor* troši brže lignin iz drveta od celuloze te uzrokuje bijelo truljenje. U laboratoriju se može uzgajati pomoću SSF i SmF, ovisno o konačnom cilju (Tišma i sur., 2021).

2.4. LIGNOLITIČKI ENZIMI

Lignolitički enzimi dobiveni iz gljiva bijelog truljenja mogu imati široku primjenu u biotehnološkim procesima. Ograničena je njihova primjena kao slobodnih enzima zbog nestabilnosti, visoke cijene i nemogućnosti ponovne upotrebe. Slobodni enzimi nestabilni su pri visokim temperaturama, ekstremnim pH vrijednostima, u organskim otapalima i u prisutnosti toksičnih reagensa. U znanstvenim istraživanjima razvijaju se novi postupci imobilizacije za pripremu stabilnih, višekратно upotrebljivih i jeftinih enzimskih materijala. Neke od tehnika imobilizacije su korištenje nosača na koje se enzimi kovalentno ili fizički spajaju, te tehnike bez korištenja nosača gdje dolazi do stvaranja enzimi umreženih agregata (CLEA) ili kristala (CLEC) (Asgher i sur., 2014; Voběrková i sur., 2018).

Gljive bijelog truljenja proizvode izvanstanične enzime kao što su lakaza, mangan peroksidaza i lignin peroksidaza koji su važni katalizatori za recikliranje organskog materijala u ekosustavima (Voběrková i sur., 2018).

Lignolitički enzimi se posljednjih godina koriste u sve više industrijskih procesa te pronalaze primjenu u proizvodnji biogoriva druge generacije. Lakaza, mangan peroksidaza i lignin peroksidaza mogu se koristiti za razgradnju ksenobiotika, estrogenih spojeva i drugih onečišćivača okoliša koji su inače otporni na mikrobnu razgradnju (Voběrková i sur., 2018).

2.4.1. Lakaza

Lakaze (benzendiol: kisik oksidoreduktaze, EC 1.10.3.2.) su multibakreni enzimi koje u prirodi osim gljiva bijelog truljenja proizvode više biljke, neki kukci i bakterije. Kataliziraju oksidaciju uglavnom fenolnih spojeva prijenosom jednog elektrona uz popratnu reakciju redukcije kisika u vodu. Mogu oksidirati samo one fenole i aromatske ili alifatske amine koji imaju niži redoks potencijal od njih samih te koji su dovoljno mali da uđu u njihov aktivni centar. Postoje redoks

medijatori koji djeluju kao prijenosnici elektrona između oksidirane lakaze i ciljnog supstrata. Dodatkom medijatora, lakaze mogu oksidirati velike količine molekula. Budući da lakaze trebaju samo kisik za svoje katalitičko djelovanje i jedini nusproizvod im je voda, imaju veliku upotrebu u brojnim tehnološkim i industrijskim procesima. Koriste se za obezbojenje raznih boja, razgradnju fenolnih zagađivača, izbjeljivanje otpadnih voda postrojenja, izbjegavanje neželjene oksidacije komponenata hrane te proizvodnju biosenzora za analizu fenolnih spojeva (Rodríguez-Couto, 2018; Voběrková i sur., 2018).

Gljive bijelog truljenja, posebice *T. versicolor*, pogodni su proizvođači lakaze budući da mogu osigurati dobre prinose lakaze i proizvode lakazu s visokom katalitičkom aktivnosti. Korištenje lignoceluloznog otpada ili industrijskih nusproizvoda kao supstrata uvelike smanjuje troškove proizvodnje ovog enzima (Tišma i sur., 2012; Xu i sur., 2020).

2.4.2. Mangan peroksidaza

Mangan peroksidaza (MnP; EC 1.11.1.13.) najčešća je peroksidaza koja modificira lignin. Proizvode ju gotovo sve vrste Basidiomycota koje koloniziraju drvo i uzrokuju bijelo truljenje. Mangan peroksidaza je glikozilirani hemski protein koji je pronađen u više oblika. Molekularna masa mu iznosi 40-50 kDa. Prirodna funkcija mangan peroksidaze je razgradnja kompleksnog polimera lignina viših biljaka. Može oksidirati fenolne i nefenolne jedinice lignina, kao i Mn^{2+} u Mn^{3+} pomoću vodikovog peroksida. Mn^{3+} vrlo je reaktivan i kompleksira se s dikarboksilnim kiselinama (malat i oksalat) koje proizvodi gljiva. Mn^{3+} kompleksi organskih kiselina oksidiraju fenolne strukture u ligninu, pri čemu nastaju nestabilni slobodni radikali koji uzrokuju spontano raspadanje. Sirovi (nepročišćena) mangan peroksidaza katalizirati reakcije obezvojenja bojila indigo crvena. Dokazano je i da imobilizirana mangan peroksidaza razgrađuje boje. Toksičnost boja u vodenim otopinama značajno je smanjena nakon tretmana ovim enzimom (Hofrichter, 2002; Voběrková i sur., 2018).

2.4.3. Lignin peroksidaza

Lignin peroksidaza (LiP; EC 1.11.1.14.) je hemski glikoprotein. Molekularna masa iznosi 38-42 kDa. Ovaj enzim katalizira oksidaciju fenolnih nefenolnih podjedinica lignina uz prisustvo vodikovog peroksida. Potencijalno može oksidirati ksenobiotike koje je obično teško cijepati drugim peroksidazama (Voběrková i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je:

- a) provesti fermentaciju na čvrstim nosačima tijekom 15 dana, koristeći *T. versicolor* TV-6 kao mikroorganizam i pivski trop kao supstrat,
- b) svakodnevno mjeriti gubitak na masi supstrata, udio suhe tvari i pH,
- c) mjeriti aktivnosti enzima lakaze, mangan peroksidaze i lignin peroksidaze,
- d) odrediti koncentraciju ukupnih polifenola, flavonoida, proantocijanidina te pojedinačnih polifenolnih spojeva.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Supstrat i mikroorganizam

Kao supstrat u ovom radu korišten je pivski trop osušen na 45 °C tijekom 48 h i skladišten na 25 °C. Korišten je soj mikroorganizma gljive bijelog truljenja *T. versicolor*, TV-6 (Ljubljana, Slovenija). Kultura je uzgajana na krumpirovom dekstroza agaru (Liofilchem S.r.l., Via Scozia, Roseto degli Abruzzi TE, Italija) (**Slika 4**) tijekom 14 dana pri 27 °C u inkubatoru bez ventilacije (BINDER GmbH, Tuttlingen, Njemačka) (**Slika 5**).



Slika 4 Kultura *T. versicolor* uzgojena na krumpirovom dekstroza agaru



Slika 5 Inkubator (BINDER GmbH, Tuttlingen, Njemačka)

3.2.2. Kemikalije

Korištene kemikalije: krumpirov dekstroza agar (Liofilchem S.r.l., Via Scozia, Roseto degli Abruzzi TE, Italija), glicin (Acros Organics, Geel, Belgija), klorovodična kiselina (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, SAD), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), malonska kiselina (Acros Organics, Geel, Belgija), 1M natrijev hidroksid (Grammol, Zagreb, Hrvatska), 2,6-dimetoksifenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), manganov (II) sulfat (Acros Organics, Geel, Belgija), 30% vodikov peroksid (Grammol, Zagreb, Hrvatska), tartaratna kiselina (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, SAD), Na-tartarat-dihidrat 99 % (Acros Organics, Geel, Belgija), veratrilni alkohol (Acros Organics, Geel, Belgija), natrijev nitrit (Grammol, Zagreb, Hrvatska), aluminijski klorid heksahidrat (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, SAD), željezov (II) sulfat heptahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska), Folin – Ciocalteuov reagens (Kefo, Sisak, Zagreb), natrijev karbonat (T.T.T., Zagreb, Hrvatska), 1-butanol (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, SAD).

3.2.3. Priprema otopina

Priprema krumpirovog dekstroza agara

10,5 g krumpirovog dekstroza agara suspendirano je u 250 mL destilirane vode i 15 minuta sterilizirano u autoklavu na 121°C. U prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice prenesena je

djelomično ohlađena otopina krumpirovog dekstroza agara koja je korištena za kultivaciju *T. versicolor* pri sterilnim uvjetima.

Glicin-HCl pufer, pH 3,5

Za pripremu ovog pufera korištene su 0,2 M otopina glicina i 0,2 M otopina HCl-a. 0,2 M otopine glicina pripremljena je otapanjem 3,75 g glicina u 250 mL destilirane vode. U 50 mL otopine glicina dodano je 6,4 mL HCl-a te je destiliranom vodom dopunjeno do 200mL. Po potrebi vršena je korekcija pH s HCl.

ABTS

0,0412 g ABTS-a (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) otopljeno je u 25 mL Glicin-HCl pufera.

Na-malonatni pufer, pH 4,5

Otapanjem 5,203 g malonske kiseline u 500 mL destilirane vode pripremljena je 0,1 M otopina malonske kiseline te je pH korigiran s 1 M NaOH. Iz navedenog je pripremljen 50 mM Na-malonatni pufer.

1 mM DMP

Otopljeno je 0,0122 g DMP-a (2,6-dimetoksifenol) u 10 mL 50 mM Na-malonatnog pufera.

1mM MnSO₄

Otopljeno je 0,0338 g manganova (II) sulfata u 20 mL 50 mM Na-malonatnog pufera.

Otopina vodikovog peroksida

Pomiješano je 255 µL 30%-tnog vodikovog peroksida s 100 mL destilirane vode.

0,4 M Na-tartaratni pufer, pH 3

Otapanjem 3,7523 g tartaratne kiseline u 250 mL destilirane vode pripremljena je 0,1 M otopina tartaratne kiseline. Otapanjem 17,256 g Na-tartarat dihidrata u 250 mL destilirane vode pripremljena je 0,3 M otopina Na-tartarat dihidrata. Ove dvije otopine su pomiješane te je korigiran pH.

0,02 M veratrilni alkohol

Otopljeno je 0,0876 g 96%-tnog veratrilnog alkohola u 25 mL Na-tartaratnog pufera.

5 %-tna vodena otopina natrijevog nitrita

Otopljeno je 5 g natrijevog nitrita u 100 mL destilirane vode.

10 %-tna vodena otopina aluminij (III)-klorid heksahidrata

Otopljeno je 10 g aluminij (III)-klorid heksahidrata u 100 mL destilirane vode.

Otopina željezo (II)-sulfat heheptahidrata

Otopljeno je 77 mg željezo (II)-sulfat heheptahidrata u 20 mL otopine kloridne kiseline i 1-butanola pomiješano je u omjeru 2:3.

Otopina natrijevog karbonata

Otopljeno je 200 g natrijevog karbonata u 800 mL destilirane vode i zagrijano do vrenja.

Nakon hlađenja dodani su kristali natrijevog karbonata, otopina je nakon 24 h profiltrirana i tikvica je nadopunjena destiliranom vodom do oznake 1 L.

3.3. METODE

3.3.1. Fermentacija na čvrstim nosačima

U laboratorijske teglice volumena 720 mL odvagano je 30 g osušenog pivskog tropa te je dodano 50 mL destilirane vode. Sadržaj u laboratorijskim teglicama dobro je promiješan i steriliziran u autoklavu (ASTELL AMA270, Kent, Ujedinjeno Kraljevstvo) (**slika 6**) 15 minuta na 121°C.



Slika 6 Autoklav (ASTELL AMA270, Kent, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Laboratorijske teglice su nakon sterilizacije ohlađene na sobnu temperaturu. Supstrat u teglicama inokuliran je micelijskim diskovima *T. versicolor* kultiviranih na PDA agaru. 5 micelijskih diskova *T. versicolor* promjera 1 cm suspendirano je u 10 mL destilirane vode i preneseno u svaku teglicu pri sterilnim uvjetima. Fermentacija u trajanju od 15 dana provedena je u inkubatoru bez ventilacije pri 27°C (**Slike 7 i 8**).



Slika 7 *T. versicolor* na pivskom tropu nakon 4. dana fermentacije



Slika 8 *T. versicolor* na pivskom tropu nakon 8. dana fermentacije

3.3.2. Gubitak na masi supstrata i određivanje pH vrijednosti supstrata

Nakon svakog dana fermentacije mjerena je masa reakcijske smjese koja se sastoji od pivskog tropa, vode i mikroorganizma s ciljem mjerenja gubitka mase supstrata uslijed metaboličke aktivnosti mikroorganizma. Dodatno, mjerena je i pH na način da je izvagano 2 g fermentiranog supstrata i pomiješano s 10 mL destilirane vode. Ekstrakcija je provedena na vorteksu (Vortex MX-S, DLAB Scientific, Kina) (Slika 9) u intervalima od 5 min, tijekom 30 min. Nakon toga mjerena je pH vrijednost pH metrom (MA 5740, Iskra, Slovenija) (slika 10).



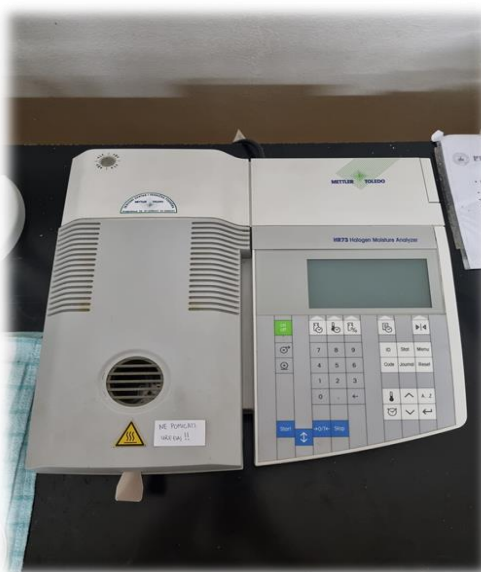
Slika 9 Vorteks (Vortex MX-S, DLAB Scientific, Kina)



Slika 10 pH metar (MA 5740, Iskra, Slovenija)

3.3.3. Udio suhe tvari

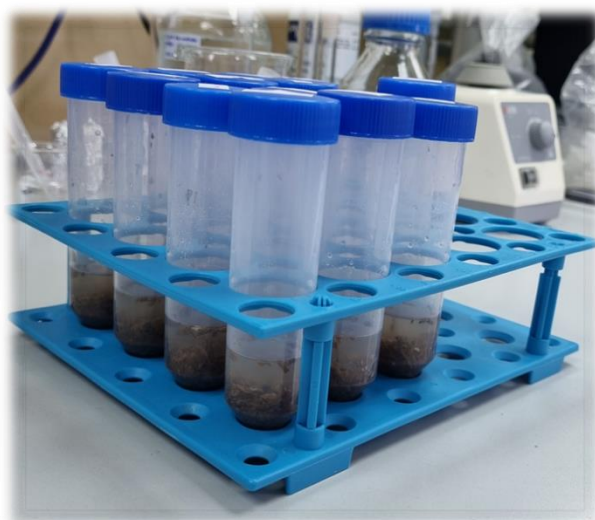
Udio suhe tvari određen je u početnom supstratu (prije inokulacije) te u fermentiranom supstratu nakon svakog dana fermentacije. Mjerenje je provedeno termo gravimetrijskom metodom na analizatoru vlage za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo) (Slika 11). 1 g uzorka odvađan je na aluminijski podložak i provedeno je sušenje na 105 °C s kriterijem završetka procesa (engl. switch off 3: gubitak mase od 1 mg u 50 s). Sušenje je provedeno do konstantne mase.



Slika 11 Analizator vlage (HR-73, Mettler Toledo)

3.3.4. Ekstrakcija enzima

Nakon svakog dana fermentacije izvagano je 2 g uzorka i pomiješano s 10 mL odgovarajućeg pufera za mjerenje aktivnosti enzima. Za mjerenje aktivnosti lakaze fermentirani supstrat ekstrahiran je u glicin-HCl puferu (pH 3,5), za mangan peroksidazu u Na-malonatnom puferu (pH 4,5) te za lignin peroksidazu u 0,4 M Na-tartaratnom puferu (pH 3). Ekstrakcija je provedena miješanjem na vorteksu u trajanju od 30 min, s intervalima od 5 min (**Slika 12**).



Slika 12 Uzorci fermentiranog pivskog tropa nakon ekstrakcije

Nakon toga uzorci su centrifugirani (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka) (**Slika 13**) na 10000 rcf, 5 min. Supernatanti su korišteni dalje za mjerenje aktivnosti lignolitičkih enzima.



Slika 13 Centrifuga (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)

3.3.5. Mjerenje aktivnosti enzima

Aktivnosti lignolitičkih enzima mjerene su spektrofotometrijski (UV-1280 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japan) (**Slika 14**). Volumne i specifične aktivnosti enzima izračunate su prema **formulama (1) i (2)**:

$$V.A. = \frac{dA}{dt} \cdot \frac{f_{\text{razrjeđenja}} \cdot V_{\text{reakcije}}}{\epsilon \cdot V_E \cdot d} \left[\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] \quad (1)$$

gdje su:

V.A. – volumna aktivnost enzima [U/mL]

dA/dt – promjena apsorbancije u vremenu [1/min]

f_{razrjeđenja} – faktor razrjeđenja

V_{reakcije} – ukupan volumen reakcijske smjese u kiveti [mL]

ε – ekstincijski koeficijent [L/(mmol cm)]

V_E – volumen dodanog enzima [mL]

d – promjer kivete [cm]

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_{\text{proteina}}} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right] \quad (2)$$

gdje su:

S.A. – specifična aktivnost enzima [U/mg]

V.A. – volumna aktivnost enzima [U/mL]

γ_{proteina} – masena koncentracija enzima [mg/mL]



Slika 14 Spektrofotometar (UV-1280 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japan)

Mjerenje aktivnosti lakaze

Aktivnost enzima lakaze mjerena je prema metodi Tišma i sur. (2020), spektrofotometrijski pri valnoj duljini $\lambda = 420 \text{ nm}$ i temperaturi $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ u kvarcnoj kiveti volumena $V = 1 \text{ mL}$. Otopina ABTS-a termostatorana je na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ prije početka mjerenja. U kvarcnu kivetu prvo je dodano $900 \text{ }\mu\text{L}$ ABTS-a, a zatim $100 \text{ }\mu\text{L}$ enzima. Sadržaj kivete brzo je ručno promiješan i stavljen u spektrofotometar. Tijekom 100 s mjerena je promjena apsorbancije u vremenu (dA/dt). Iz dobivenih vrijednosti dinamičke promjene apsorbancije izračunate su volumna i specifična aktivnost lakaze prema jednadžbama **(1)** i **(2)**.

Mjerenje aktivnosti mangan peroksidaze

Aktivnost enzima mangan peroksidaze mjerena je prema metodi Lueangjaroenkit i sur. (2020), spektrofotometrijski pri valnoj duljini $\lambda = 469 \text{ nm}$ i temperaturi $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ u kvarcnoj kiveti volumena $V = 1 \text{ mL}$. U kvarcnu kivetu dodano je redom $640 \text{ }\mu\text{L}$ Na-malonatnog pufera (pH 4,5), $100 \text{ }\mu\text{L}$ 1 mM MnSO_4 , $100 \text{ }\mu\text{L}$ DMP-a, $100 \text{ }\mu\text{L}$ enzima i $60 \text{ }\mu\text{L}$ vodikovog peroksida. Reakcija je započeta dodatkom vodikovog peroksida. Sadržaj kivete ručno je promiješan i stavljen u spektrofotometar. Tijekom 100 s mjerena je promjena apsorbancije u vremenu (dA/dt). Iz dobivenih promjena apsorbancije izračunate su volumna i specifična aktivnost mangan-peroksidaze prema jednadžbama **(1)** i **(2)**.

Mjerenje aktivnosti lignin peroksidaze

Aktivnost enzima lignin peroksidaze mjerena je prema metodi Karpe i sur. (2016), spektrofotometrijski pri valnoj duljini $\lambda = 310$ nm i temperaturi $T = 25^\circ\text{C}$ u kvarcnoj kiveti volumena $V = 1$ mL. U kvarcnu kivetu dodano je redom 660 μL Na-tartaratnog pufera, 200 μL veratrilnog alkohola, 100 μL enzima i 40 μL vodikovog peroksida. Reakcija je započeta dodatkom vodikovog peroksida. Sadržaj kivete ručno je promiješan i stavljen u spektrofotometar. Tijekom 100 s mjerena je promjena apsorbancije u vremenu (dA/dt). Iz dobivenih promjena apsorbancije izračunate su volumna i specifična aktivnost lignin peroksidaze prema jednadžbama (1) i (2).

Bradfordičina metoda

Bradfordičina metoda temelji se na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje „Coomassie Brilliant Blue G-250“ za aromatske i bazične bočne ogranke proteina. Anionski oblik bojila, koji se veže za proteine, ima λ maksimum od 595 nm. Na toj valnoj duljini mjeri se apsorbancija za protein (Kruger, 2009).

100 μL ekstrakta enzima i 2 mL svježe pripremljenog Bradfordičinog reagensa dodano je u kivetu. Reakcijska smjesa ostavljena je stajati na sobnoj temperaturi 5 minuta. Nakon 5 minuta očitana je apsorbancija pri valnoj duljini 595 nm.

3.3.6. Određivanje koncentracije polifenolnih spojeva

Određivanje koncentracije flavonoida

Određivanje koncentracije flavonoida provedeno je prema metodi Marinova i sur. (2005). 500 μL ekstrakta dodano je u 2 mL destilirane vode. Zatim je dodano 150 μL 5%-tnog natrijevog nitrita te nakon 5 minuta 150 μL 10%-tne vodene otopine aluminijskog (III) klorid heksahidrata. Nakon 6 minuta dodano je 1 mL 1 M natrijevog hidroksida. Reakcijska smjesa nadopunjena je destiliranom vodom do 5 mL. Slijepa proba pripremljena je na isti način, samo je umjesto ekstrakta dodan jednak volumen (500 μL) destilirane vode. Uzorci su promiješani na vorteksu te je mjerena apsorbancija na $\lambda = 510$ nm.

Određivanje koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina

Određivanje koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina provedeno je prema metodi Avallone i sur. (1997) i Škerget i sur. (2005). U 500 μL ekstrakta dodano je 5 mL otopine željezo (II) sulfat heptahidrata. Slijepa proba pripremljena je na isti način, samo je umjesto ekstrakta dodan jednak volumen (500 μL) destilirane vode. Uzorci su inkubirani u vodenoj kupelji 15 minuta pri 95 °C. Nakon inkubacije uzorci su ohlađeni te je mjerena apsorbancija na $\lambda = 540 \text{ nm}$.

Određivanje koncentracije ukupnih polifenola

Određivanje koncentracije ukupnih polifenola provedeno je prema metodi Waterhouse (2001). U epruvetu je dodano 40 μL ekstrakta, 3160 μL destilirane vode i 200 μL Folin – Ciocalteuova reagensa. Sadržaj epruvete dobro je promiješan na vorteksu. Nakon 8 min dodano je 600 μL 20 % - tne otopine Na_2CO_3 . Sadržaj epruvete ponovno je promiješan na vorteksu. Slijepa proba pripremljena je na isti način, samo je umjesto ekstrakta dodan isti volumen (40 μL) ekstrakcijskog otapala. Uzorci su inkubirani u vodenoj kupelji 30 minuta na 40 °C. Nakon inkubacije očitana je apsorbancija pri $\lambda = 765 \text{ nm}$.

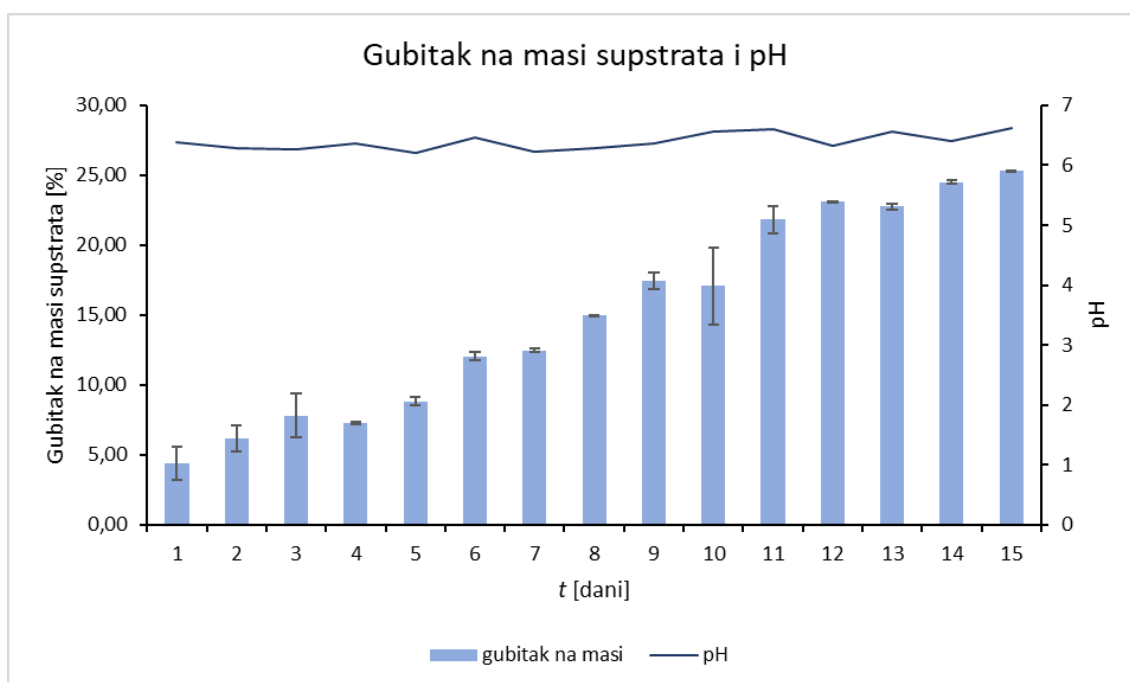
Određivanje koncentracije pojedinačnih polifenolnih spojeva

Određivanje koncentracije pojedinačnih polifenolnih spojeva provedeno je prema metodi Panić i sur. (2021). Za određivanje je korišten HPLC uređaj spojen s diodnim detektorom i automatskim uzorkivačem. Prije injektiranja, uzorak volumena 15 μL filtriran je kroz politetrafluoretilenske filtere s veličinom pora od 0,22 μL . Temperatura kolone odražavana je na 40°C. Separacija je provedena na koloni Poroshell 120 SB C18. Kao mobilne faze korištene su voda s 25%-tnim acetonom i voda s acetonitrilom. Retencijska vremena i spektralni podaci polifenolnih spojeva uspoređeni su sa standardima. HPLC analize su provedene u tri ponavljanja, a sadržaj polifenola je izražen kao mg spoja/g suhe tvari.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UZGOJ *TRAMETES VERSICOLOR* NA PIVSKOM TROPU U UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Uzgoj *T. versicolor* proveden je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Fermentacija je trajala 15 dana. Provedena je u laboratorijskim staklenkama, koristeći pivski trop kao supstrat. Tijekom fermentacije vlažnost pivskog tropa povećala se s početne vrijednosti 64,65 % (1. dan fermentacije) do maksimalne vrijednosti 67,65 % (15. dan fermentacije). Ovaj raspon vlažnosti odgovara uvjetima za rast *T. versicolor* te tijekom fermentacije nije bilo potrebno dodavati vodu. Naime, udio vlage važan je čimbenik provedbe SSF procesa. Kruti supstrat mora imati dovoljnu količinu vlage da bi bio omogućen rast i razvoj radnog mikroorganizama. Previsok udio vlage pak dovodi do zbijanja krutog supstrata pri čemu dolazi do sprječavanja prijenosa kisika do radnog mikroorganizma, ali i nedostupnosti hranjivih tvari iz supstrata. Također, prenizak udio vlage onemogućava transport hranjivih tvari i sintezu enzima (Zeko-Pivač i sur., 2022). Vrijednosti pH supstrata bile su u rasponu od 6,14 i 6,82 što znači da nije došlo do nastanka organskih kiselina kao produkata razgradnje lignoceluloznih sastavnica koje bi uzrokovale smanjenje pH. Nakon 15 dana fermentacije ukupan gubitak na masi supstrata iznosio je 25,33 %. Rezultati pH vrijednosti i gubitaka mase supstrata tijekom 15 dana fermentacije prikazani su na **slici 15**.



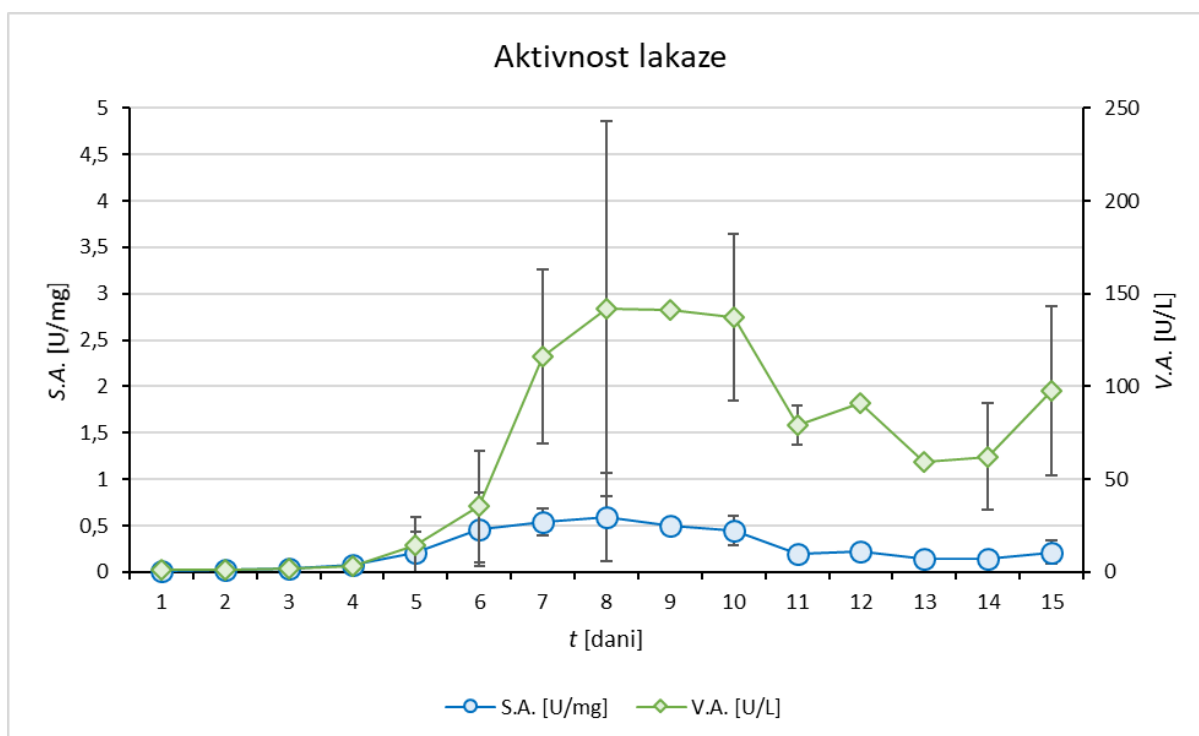
Slika 15 pH vrijednost supstrata i gubitak na masi supstrata praćene tijekom 15 dana uzgoja *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

(Početni procesni uvjeti: $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$, m (supstrata) = 30 g, udio vlage supstrata = 64,65 %)

4.2. PROIZVODNJA LIGNOLITIČKIH ENZIMA UZGOJEM *TRAMETES VERSICOLOR* NA PIVSKOM TROPU U UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA

4.2.1. Proizvodnja enzima lakaza uzgojem *Trametes versicolor* na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Proizvodnja enzima lakaza provedena je u laboratorijskim staklenkama koristeći *T. versicolor* kao mikroorganizam i pivski trop kao supstrat. Inkubacija je provedena pri 27 °C u inkubatoru bez ventilacije u trajanju od 15 dana. Rezultati su prikazani na **slici 16**, gdje je vidljivo da su najveće vrijednosti i volumne i specifične aktivnosti enzima lakaze postignute nakon 8. dana fermentacije. Najveća vrijednost volumne aktivnosti lakaze iznosila je 141,7 U/L, dok je najveća vrijednost specifične aktivnosti lakaze iznosila 0,6 U/mg.



Slika 16 Aktivnost enzima lakaze tijekom 15 dana fermentacije

(Početni procesni uvjeti: $T = 27$ °C, m (supstrata)= 30 g, udio vlage supstrata= 67,6 %)

Rezultati su uspoređeni s literaturom. Tavares i sur. (2006) pokazali su da su optimalni uvjeti za proizvodnju lakaze pomoću *T. versicolor* koncentracija glukoze od 11 g/L i pH vrijednost 5,2.

Eksperimenti su provedeni u uvjetima submerzne fermentacije, koristeći TDM (*Trametes* definirani medij) kao supstrat te je postignuta volumna aktivnost lakaze od 11403 U/L.

Xu i sur. (2020) proizvodili su lakazu uzgojem *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, koristeći kao supstrat ostatke čaja dobivene prilikom proizvodnje čajnih napitaka u jednoj kineskoj tvornici. Istraživanjem su pokazali da se korištenjem ovog supstrata za uzgoj *T. versicolor* postiže najveća specifična aktivnost lakaze od 25,7 U/g suhog supstrat nakon 7. dana fermentacije.

Tišma i sur. (2012) u svom istraživanju testirali su proizvodnju lakaze pomoću *T. versicolor* na raznim industrijskim otpadima. Ovim istraživanjem dokazali su da kruti otpad iz tvornice za proizvodnju papira ima najveći potencijal za proizvodnju lakaze, postizanjem najveće volumne aktivnosti od 2378 U/L. Također je dokazano da ovaj otpad sadrži CaCO₃ koji stimulira proizvodnju lakaze. *T. versicolor* uzgajana je u uvjetima submerzne fermentacije, uz optimizaciju medija pomoću genetskog algoritma.

Tišma i sur. (2018) koristili su pivski trop kao supstrat za proizvodnju lakaze pomoću *T. versicolor*. Maksimalna volumna aktivnost postignuta je nakon 7. dana fermentacije i iznosila je 560 U/L. Pivski trop korišten u ovom istraživanju dobiven je nakon proizvodnje piva iz mješavine 60% ječma i 40% slada, što ga razlikuje od pivskog tropa korištenog u ovom diplomskom radu. Zbog toga se razlikuju i maksimalne volumne aktivnosti. U ovom diplomskom radu postignuta je maksimalna volumna aktivnost nakon 8. dana fermentacije i iznosila je 141,7 U/L.

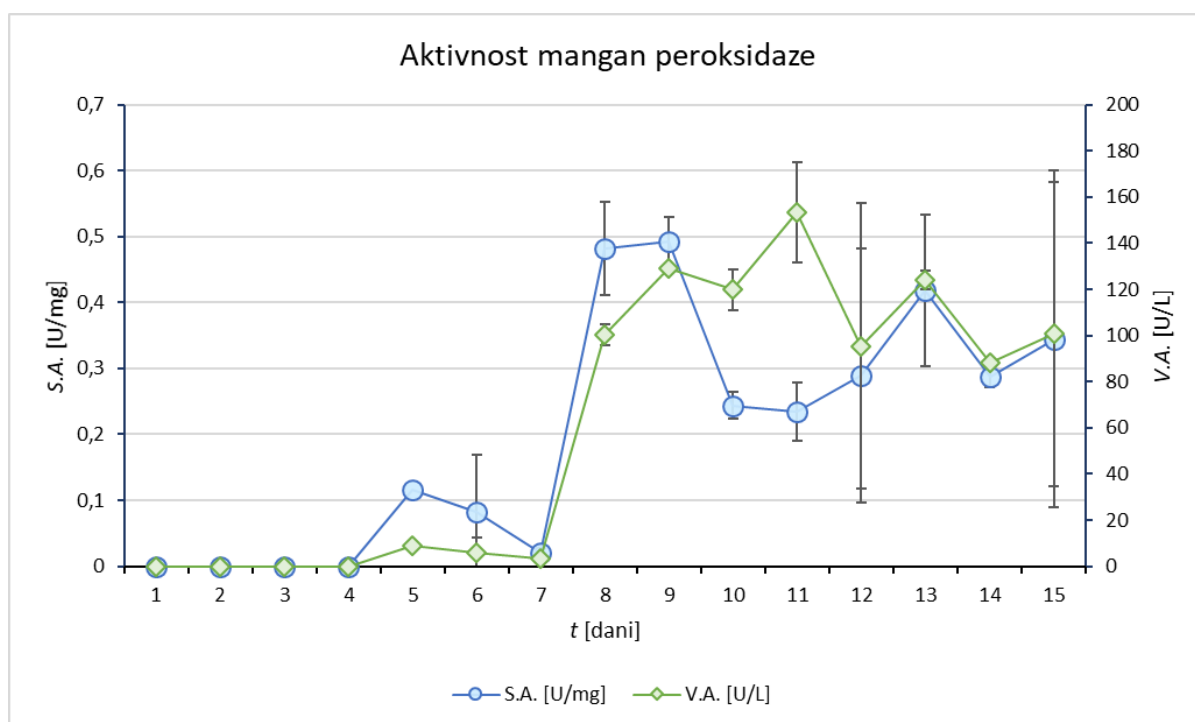
Erden i sur. (2009) proizvodili su lakazu i mangan peroksidazu uzgojem *T. versicolor* u uvjetima submerzne fermentacije na različitim poljoprivrednim ostacima. Pokazali su da ljuske lješnjaka imaju najveći potencijal za proizvodnju lakaze, postizanjem maksimalne volumne aktivnost od 47,09 U/L. Optimalni uvjeti za proizvodnju lakaze bili su: vrijeme inkubacije od 4 dana, koncentracija ljuski lješnjaka 2% w/v, pH 6, broj okretaja tijekom centrifugiranja od 130 rpm.

Bucić-Kojić i sur. (2017) koristili su kukuruznu silažu za proizvodnju lakaze uzgojem *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Istraživanjem je postignuta maksimalna volumna aktivnost lakaze od 180,2 U/L nakon 4. dana fermentacije, pri pH 3 i temperaturi od

50°C. Također je dokazano da dodatak bakrovog (II) sulfata kao induktora rezultira povećanjem aktivnosti lakaze za 8,5 puta.

4.2.2. *Proizvodnja enzima mangan peroksidaza uzgojem *Trametes versicolor* na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima*

Proizvodnja enzima mangan peroksidaze provedena je u laboratorijskim staklenkama koristeći *T. versicolor* kao mikroorganizam i pivski trop kao supstrat. Inkubacija je provedena pri 27 °C u inkubatoru bez ventilacije u trajanju od 15 dana. Rezultati su prikazani na **slici 17** gdje je vidljivo da je najveća volumna aktivnost postignuta nakon 11. dana fermentacije i iznosila je 153,3 U/L. Najveća specifična aktivnost postignuta je nakon 9. dana fermentacije i iznosila je 0,5 U/mg.



Slika 17 Aktivnost enzima mangan peroksidaze tijekom 15 dana fermentacije

(Početni procesni uvjeti: $T=27\text{ °C}$, m (supstrata)= 30 g, udio vlage supstrata= 67,6 %)

Asgher i sur. (2011) koristili su klipove kukuruza, kao supstrat, za uzgoj *T. versicolor* u SSF uvjetima te je ostvarena maksimalna volumna aktivnost mangan peroksidaze od 964 U/L. Ova aktivnost postignuta je dodatkom glukoze i ekstrakta kvasca s omjerom ugljika i dušika 25:1.

Erden i sur. (2009) proizvodili su lakazu i mangan peroksidazu uzgojem *T. versicolor* u uvjetima submerzne fermentacije pri čemu su korišteni različiti poljoprivredni ostatci. Pokazali si da

ljuske lješnjaka imaju najveći potencijal za proizvodnju mangan peroksidaze, postizanjem maksimalne volumne aktivnosti od 109,21 U/L. Optimalni uvjeti za proizvodnju mangan peroksidaze bili su: vrijeme inkubacije od 5 dana, koncentracija ljuski lješnjaka 2% w/v, pH 6, broj okretaja tijekom centrifugiranja od 90 rpm.

Bucić-Kojić i sur. (2017) koristili su kukuruznu silažu za proizvodnju mangan peroksidaze uzgojem *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Istraživanjem je postignuta maksimalna volumna aktivnost mangan peroksidaze od 30,1 U/L nakon 3. dana fermentacije. Također je dokazano da dodatak bakrovog (II) sulfata kao induktora rezultira povećanjem aktivnosti mangan peroksidaze za 7 puta.

4.2.3. Proizvodnja enzima lignin peroksidaza uzgojem *Trametes versicolor* na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Tijekom 15 dana uzgoja *T. versicolor* na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima nije došlo do sinteze enzima lignin peroksidaza.

Fujian i sur. (2001) koristili su pšeničnu slamu, kao supstrat, za proizvodnju lignin peroksidaze uzgojem *Phanerochaete chrysosporium* u SSF uvjetima. U ovom istraživanjima ostvarena je maksimalna volumna aktivnost lignin peroksidaze od 2600 U/L.

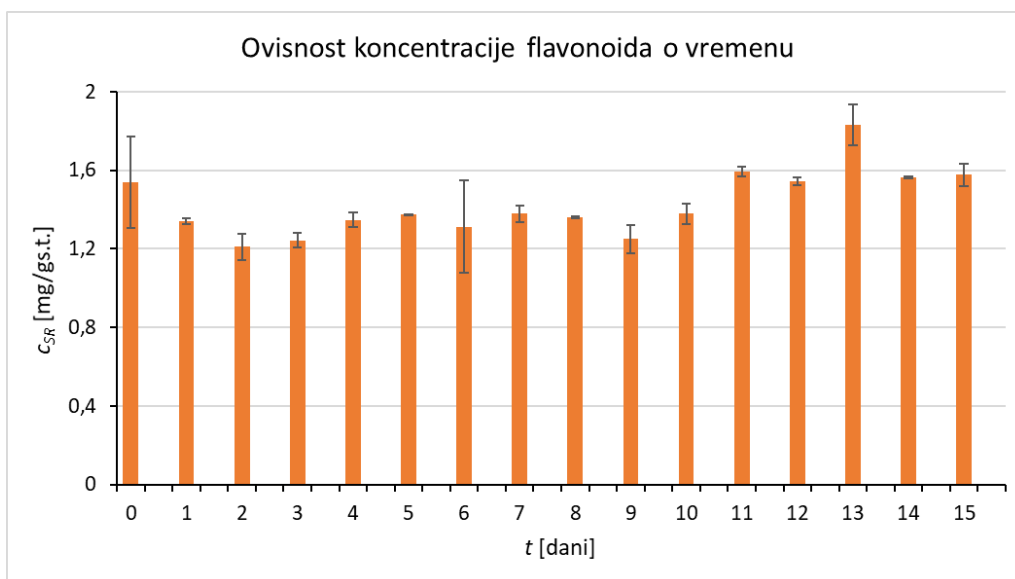
Mehboob i sur. (2011) proizvodili su lignin peroksidazu koristeći *Ganoderma lucidum* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, koristeći klipove kukuruza kao supstrat. Istraživanjem je postignuta maksimalna volumna aktivnost lignin peroksidaze od 2807 U/L nakon 4. dana fermentacije. Asgher i sur. (2012) su na istom supstratu uzgajali *T. versicolor* IBL-04 pri čemu je nakon 5. dana fermentacije postignuta maksimalna volumna aktivnost enzima od 592 U/L.

4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE POLIFENOLNIH SPOJEVA TIJEKOM PROIZVODNJE LIGNOLITIČKIH ENZIMA UZGOJEM *TRAMETES VERSICOLOR* NA PIVSKOM TROPU U UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA

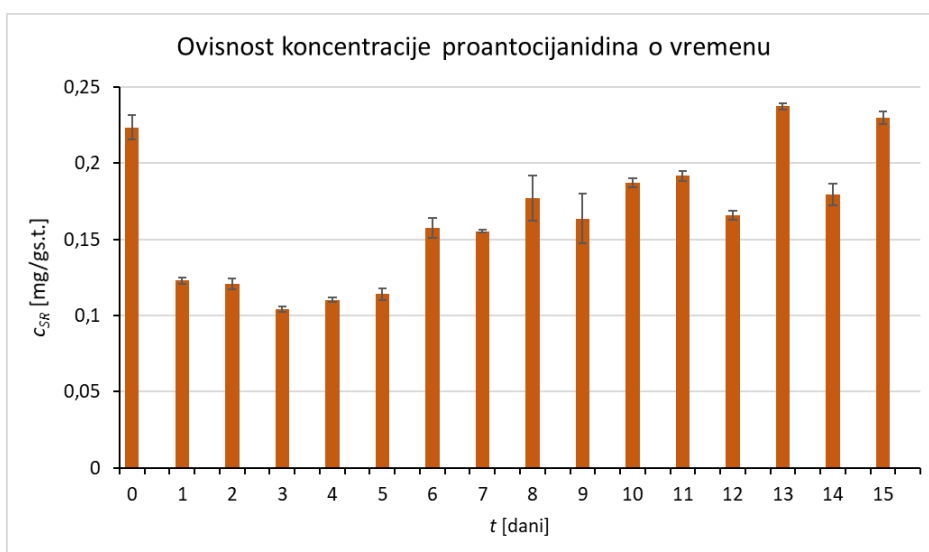
4.3.1. Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida, proantocijanidina i polifenola

Osim mjerenja aktivnosti lignolitičkih enzima, tijekom 15 dana uzgoja *T. versicolor* na pivskom tropu, analizirane su i koncentracije ukupnih flavonoida, proantocijanidina i polifenola. Dobiveni rezultati prikazani su na **slici 18 a, b i c**. Najveća koncentracija ukupnih flavonoida postignuta je nakon 13. dana i iznosila je 1,8293 mg/g *s.t.*. U početnom uzorku pivskog tropa, prije inokulacije, koncentracija flavonoida bila je niža i iznosila je 1,5387 mg/g *s.t.*. Najveća koncentracija ukupnih proantocijanidina postignuta je također nakon 13. dana i iznosila je 0,2373 mg/g *s.t.*. Početna koncentracija u početnom uzorku pivskog tropa bila je također niža i iznosila je 0,2235 mg/g *s.t.*. I u slučaju ukupnih polifenola uočen je rast koncentracije. Najveća koncentracija ukupnih polifenola također je postignuta nakon 13. dana (12,4945 mg/g *s.t.*), a koncentracija ukupnih polifenola u početnom uzorku iznosila je 8,0790 mg/g *s.t.* što je povećanje za 1,5 puta.

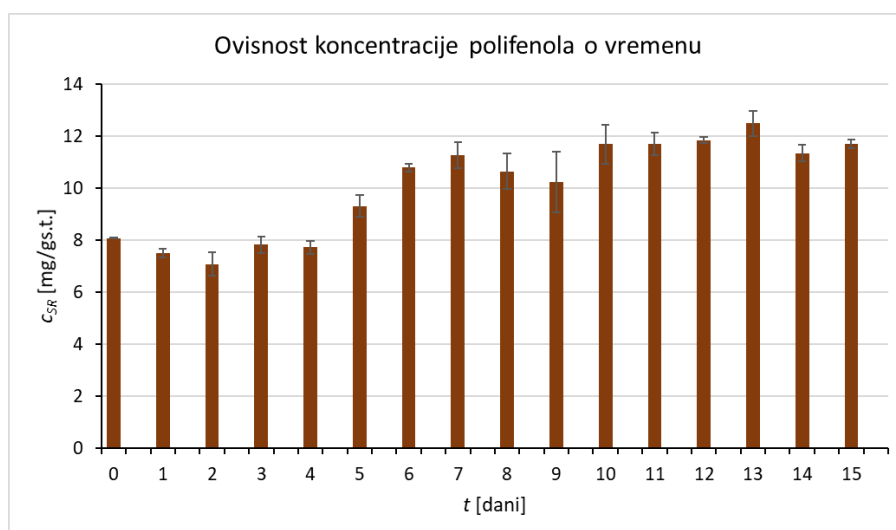
a)



b)



c)



Slika 18 Ovisnost koncentracije a) ukupnih flavonoida, b) ukupnih proantocijanidina i c) ukupnih polifenola u netretiranom i tretiranom pivskom tropu o vremenu fermentacije

Tijekom uzgoja mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima može doći do otpuštanja bioaktivnih spojeva iz složenih lignoceluloznih materijala kao što je primjerice pivski trop prvenstveno kao posljedica razgradnje lignina uslijed katalitičke aktivnosti lignolitičkih enzima (da Costa Maia i sur., 2020).

Ibarruri i sur. (2019) provodili su SSF koristeći pivski trop za supstrat i *Rhizopus* sp. kao mikroorganizam. SSF uvjeti optimizirani su faktorskim dizajnom i metodologijom odzivnih

površina. Istraživanjem su pokazali porast koncentracije ukupnih polifenola 11 puta (izmjerena vrijednost bila je 2.7 ± 0.1 mg GAE/g DM) nakon 9 dana fermentacije pri 30°C.

Zeko-Pivač i sur. (2022) koristili su 2 uzorka pivskog tropa za proizvodnju hidrolitičkih i lignolitičkih enzima, uzgojem *T. versicolor* u SSF uvjetima pri čemu su analizirali koncentracije polifenolnih spojeva. U istraživanju je došlo do porasta koncentracije ukupnih polifenolnih spojeva nakon fermentacije 3,75 puta u prvom uzorku pivskog tropa i 1,64 puta u drugom uzorku. Također, došlo je do porasta koncentracije ukupnih flavonoida nakon fermentacije 1,62 puta u prvom uzorku te 1,14 puta u drugom uzorku. SSF nije imao pozitivan učinak na otpuštanje ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina.

Tišma i sur. (2018) koristili su pivski trop za proizvodnju polifenola i enzima lakaza, uzgojem *T. versicolor* u SSF uvjetima. Nakon 14 dana fermentacije pokazali su povećanje ekstrakcije ukupnih polifenola 3,4 puta u usporedbi s netretiranim pivskim tropom i povećanje koncentracije ukupnih polifenola od 2.5 mg/g_{s.t.} do 8.7 mg/g_{s.t.}.

4.3.2. Određivanje koncentracije pojedinačnih polifenolnih spojeva

Osim analize ukupnih flavonoida, proantocijanidina i polifenola, mjerene su i koncentracije pojedinačnih polifenolnih spojeva čiji su rezultati prikazani u **tablici 4**. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su u početnom uzorku pivskog tropa prisutni engeletin i miricetin. U slučaju engeletina, nakon 1. dana fermentacije došlo je do smanjenja koncentracije s 0,3341 na 0,0858 mg/g suhe tvari, a nakon 2. dana taj spoj nije detektiran. U slučaju miricetina, došlo je do degradacije spoja već nakon 1. dana fermentacije. U netretiranom pivskom tropu nije zabilježena koncentracija siringinske kiseline, kumarinske kiseline i epikatehina, ali njihova koncentracija raste uslijed biološke obrade pri čemu je detektirana najveća koncentracija epikatehina od $0,3650 \pm 0,0302$ mg/g suhe tvari nakon 2. dana fermentacije. Najveća koncentracija siringinske kiseline (0,2147 mg/g suhe tvari) detektirana je nakon 2. dana, a kumarinske kiseline (0,2139 mg/g suhe tvari) nakon 10. dana fermentacije.

Tablica 4 Koncentracija pojedinačnih polifenolnih spojeva u netretiranom pivskom tropu i nakon fermentacije na čvrstim nosačima u trajanju od 15 dana

t [dani fermentacije]	c [mg/g suhe tvari]				
	Siringinska kiselina	Kumarinska kiselina	Epikatehin	Engeletin	Miricetin
0	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.3341 ± 0.0001	1.9634 ± 0.0007
1	0.2144 ± 0.0001	0.1501 ± 0.0304	0.3645 ± 0.0302	0.0858 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0000
2	0.2147 ± 0.0001	0.1718 ± 0.0001	0.3650 ± 0.0302	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
3	0.2139 ± 0.0000	0.1711 ± 0.0000	0.2994 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
4	0.2140 ± 0.0001	0.1498 ± 0.0302	0.2996 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
5	0.2137 ± 0.0000	0.1709 ± 0.0000	0.2564 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
6	0.0000 ± 0.0000	0.2137 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
7	0.0000 ± 0.0000	0.2136 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
8	0.0000 ± 0.0000	0.1924 ± 0.0303	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
9	0.0000 ± 0.0000	0.2136 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
10	0.0000 ± 0.0000	0.2139 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
11	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
12	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
13	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
14	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000
15	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000

Prema istraživanjima, frakcija lignina u lignoceluloznim materijalima sadrži brojne fenolne komponente, uglavnom kiseline kao što su ferulinska, kumarinska, siringinska, vanilinska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina čiju je koncentraciju moguće povećati SSF procesom (Martins i sur., 2011). Rezultati istraživanja Moreira i sur. (2013) dokazali su da vrsta i način proizvodnje slada, posebno način sušenja, mogu imati važan utjecaj na profil polifenolnih spojeva i antioksidativnih svojstava pivskog tropa. Ekstrakti iz svijetlih vrsta slada sadrže veće koncentracije ukupnih i pojedinačnih polifenolnih spojeva posebno ferulinske i kumarinske kiseline, čija koncentracija najviše ovisi o načinu sušenja slada.

Šelo (2022.) je u svom istraživanju dokazivala utjecaj biološke obrade tropa grožđa pomoću *R. oryzae* na prinos pojedinačnih polifenolnih spojeva. SSF je imao pozitivnu utjecaj na ekstraktibilnost nekih polifenolnih spojeva. Koncentracija siringinske kiseline povećala se 1,8 puta (s 0,2366 na 0,4240 mg/g_{s.t.}) nakon 5. dana fermentacije. U slučaju epikatehina i kumarinske kiseline nije došlo do povećanja koncentracije nakon SSF. Suprotno tome, korištenjem pivskog tropa u ovom diplomskom radu siringinska kiselina je detektirana tek

nakon biološke obrade ali je koncentracija (0,2147 mg/g_{s.t.}) niža od koncentracije dobivene nakon tretiranja tropa grožđa.

Lukačić (2019.) je u svom istraživanju dokazivao utjecaj biološke obrade pljevice ječma pomoću *Trametes versicolor* na ekstrakciju fenolnih kiselina. Maksimalna koncentracija siringinske kiseline (0,083 mg/g_{s.t.}) postignuta je nakon 1. dana fermentacije. Pljevica ječma nakon biološke obrade s *Trametes versicolor* sadržavala je nižu koncentraciju siringinske kiseline, nego pivski trop u ovom diplomskom radu.

Epikatehin i siringinska kiselina posjeduju antioksidativna, antimikrobna, protuupalna i antitumorska svojstva. Konzumacija epikatehina smanjuje razinu glukoze u krvi kod dijabetičara te se može koristiti kao alternativa za liječenje dijabetesa i raka. Siringinska kiselina može se također koristiti za liječenje dijabetesa i raka te liječenje oštećenja neurona i jetre (Abdulkhaleq i sur., 2017; Sirinivasulu i sur., 2018).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Nakon 15 dana fermentacije ukupan gubitak na masi supstrata iznosio je 25,33 %. pH vrijednosti supstrata iznosile su između 6,14 i 6,82.
2. *T. versicolor* uzgojem na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima proizvodi enzime lakazu i mangan peroksidazu. Najveće vrijednosti volumne i specifične aktivnosti enzima lakaze postignute su nakon 8. dana fermentacije te su iznosile 141,7 U/L i 0,6 U/mg. Najveća volumna aktivnost mangan peroksidaze postignuta je nakon 11. dana fermentacije i iznosila je 153,3 U/L, dok je najveća specifična aktivnost postignuta nakon 9. dana fermentacije i iznosila je 0,5 U/mg. U ovom istraživanju nije došlo do proizvodnje lignin peroksidaze.
3. Najveće koncentracije ukupnih flavonoida, proantocijanidina i polifenola postignute su nakon 13. dana fermentacije i iznosile su 1,8293 mg/g_{s.t.} (flavonoidi), 0,2373 mg/g_{s.t.} (proantocijanidini) i 12,4945 mg/g_{s.t.} (polifenoli).
4. Od 5 ispitanih fenolnih spojeva, u netretiranom pivskom tropu detektirana su 2 spoja. Tijekom fermentacije došlo je do porasta siringične kiseline i to s 0 na 0,2147 mg/g nakon 2. dana fermentacije, porasta *t*-kumarne kiseline s 0 na 0,2137 mg/g nakon 6. dana fermentacije, te do porasta epikatehina s 0 na 0,3645 mg/g nakon 2. dana fermentacije. Tijekom fermentacije došlo je do raganje engeletina i miricetina.

6. LITERATURA

- Abdulkhaleq LA, Assi MA, Noor MHM, Abdullah R, Saad MZ, Taufiq-Yap YH: Therapeutic uses of epicatechin in diabetes and cancer. *Veterinary world*, 10(8):869, 2017.
- Antolić A: Tehnološke mogućnosti bolje iskoristivosti pšeničnih posija. *Završni rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2017.
- Asgher M, Iqbal HMN: Characterization of a novel manganese peroxidase purified from solid state culture of *Trametes versicolor* IBL-04. *BioResources*, 6(4):4302-4315, 2011.
- Asgher M, Iqbal HMN, Irshad M: Characterization of purified and xerogel immobilized novel lignin peroxidase produced from *Trametes versicolor* IBL-04 using solid state medium of corncobs. *BMC biotechnology*, 12:1-8, 2012.
- Asgher M, Shahid M, Kamal S, Iqbal HMN: Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101:56-66, 2014.
- Avallone R, Plessi M, Baraldi M, Monzani A: Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of food composition and analysis*, 10(2):166-172, 1997.
- Bucić-Kojić A, Šelo G, Zelić B, Planinić M, Tišma M: Recovery of phenolic acid and enzyme production from corn silage biologically treated by *Trametes versicolor*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 181:948-960, 2017.
- Carvalho F, Esteves MP, Parajo JC, Pereira H, Girio FM: Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*, 91(1):93-100, 2004.
- Cooray ST, Chen WN: Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to enhance nutritional value. *Journal of Functional Foods*, 42:85-94, 2018.
- da Costa Maia I, dos Santos D'Almeida CT, Freire DMG, Cavalcanti EDAC, Cameron LC, Dias JF, Ferreira MSL: Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer's spent grain revealed by UPLC-MSE. *LWT*, 133:110136, 2020.
- Del Cerro C, Erickson E, Dong T, Wong AR, Eder EK, Purvine SO, ..., Salvachúa, D: Intracellular pathways for lignin catabolism in white-rot fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(9):e2017381118, 2021.
- Dou H, Chang Y, Zhang L: *Coriolus versicolor* polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 163:361-381, 2019.
- Erden E, Ucar MC, Kaymaz Y, Pazarlioglu NK: New and different lignocellulosic materials from Turkey for laccase and manganese peroxidase production by *Trametes versicolor*. *Engineering in Life Sciences*, 9(1):60-65, 2009.

- Fujian X, Hongzhang C, Zuohu L: Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. *Bioresource Technology*, 80(2):149-151, 2001.
- Han MJ, Choi HT, Song HG: Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *The Journal of Microbiology*, 43(6):555-560, 2005.
- Hofrichter M: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial technology*, 30(4):454-466, 2002.
- Iadecola R, Ciccoritti R, Ceccantoni B, Bellincontro A, Amoriello T: Optimization of Phenolic Compound Extraction from Brewers' Spent Grain Using Ultrasound Technologies Coupled with Response Surface Methodology. *Sustainability*, 14(6):3309, 2022.
- Ibarruri J, Cebrián M, Hernández I: Solid state fermentation of brewer's spent grain using *Rhizopus sp.* to enhance nutritional value. *Waste and Biomass Valorization*, 10(12):3687-3700, 2019.
- Ikram S, Huang L, Zhang H, Wang J, Yin M: Composition and nutrient value proposition of brewers spent grain. *Journal of food science*, 82(10):2232-2242, 2017.
- Kanauchi O, Mitsuyama K, Araki Y: Development of a functional germinated barley foodstuff from brewer's spent grain for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 59(2):59-62, 2001.
- Karpe AV, Dhamale VV, Morrison PD, Beale DJ, Harding IH, Palombo EA: Winery biomass waste degradation by sequential sonication and mixed fungal enzyme treatments. *Fungal Genetics and Biology*, 102:22-30, 2016.
- Krishna C: Solid-state fermentation systems—an overview. *Critical reviews in biotechnology*, 25:(1-2):1-30, 2005.
- Kruger NJ: The Bradford method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, 17-24, 2009.
- Marcus A, Fox G: Fungal biovalorization of a brewing industry byproduct, brewer's spent grain: A review. *Foods*, 10(9):2159, 2021.
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M: Total phenolics and flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *JU Chem. Metal*, 40(3):255-260, 2005.
- Martins S, Mussatto SI, Martínez-Avila G, Montañez-Saenz J, Aguilar CN, Teixeira JA: Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology advances*, 29(3):365-373, 2011.
- Mehboob N, Asad MJ, Imran M, Gulfranz M, Wattoo FH, Hadri SH, Asghar M: Production of lignin peroxidase by *Ganoderma leucidum* using solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 10(48):9880-9887, 2011.

- Meneses NG, Martins S, Teixeira JA, Mussatto SI: Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and purification technology*, 108:152-158, 2013.
- Mitchell D, Krieger N, Berovič M: Solid-state fermentation bioreactor fundamentals: introduction and overview. U *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*. Springer, str. 1-16. Springer, Njemačka, Berlin, 2006.
- Moreira MM, Morais S, Carvalho DO, Barros AA, Delerue-Matos C, Guido LF: Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. *Food research international*, 54(1): 382-388, 2013.
- Mussatto SI: Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(7):1264-1275, 2014.
- Mussatto SI, Roberto IC: Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process. Environmental & CleanTechnology*, 81(3):268-274, 2006.
- Lizardi-Jiménez MA, Hernández-Martínez R: Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *Biotech*, 3, 7(1):44, 2017.
- Lueangjaroenkit P, Kunitake E, Sakka M, Kimura T, Teerapatsakul C, Sakka K i Chitradon L: Light Regulation of Two New Manganese Peroxidase-Encoding Genes in *Trametes polyzona* KU-RNW027. *Microorganisms* 8(6):852, 2020.
- Lukačić T: Utjecaj biološke obrade pljevice ječma pomoću *Trametes versicolor* na ekstrakciju fenolnih kiselina. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2019.
- Obi, CN: Solid State Fermentation: Substrates Uses and Applications in Biomass and Metabolites Production-A Review. *South Asian Research Journal of Biology and Applied Biosciences*, 1(1):20-29, 2019.
- Pandey A: Solid-state fermentation. *Biochemical engineering journal*, 13:(2-3):81-84, 2003.
- Panić M, Gunjević V, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Ganić KK, Redovniković IR: Cosmotherm as an effective tool for selection of deep eutectic solvents based ready-to-use extracts from Graševina grape pomace. *Molecules*, 26(16):4722, 2021.
- Pejin JD, Radosavljević MS, Grujić OS, Mojović LV, Kocić-Tanackov SD, Nikolić SB, Djukić-Vuković AP: Mogućnosti primene pivskog tropa u biotehnologiji. *Chemical industry/Hemijska industrija*, 67(2):277-291, 2013.
- Rodríguez-Couto S: Solid-state fermentation for laccases production and their applications. *In Current developments in biotechnology and bioengineering*, 211-234, 2018.
- Srinivasulu C, Ramgopal M, Ramanjaneyulu G, Anuradha CM, Kumar CS: Syringic acid (SA)—a review of its occurrence, biosynthesis, pharmacological and industrial importance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108:547-557, 2018.

- Soccol CR, Costa ES de F, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LP de S: Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1): 52–71, 2017.
- Sousa D, Venâncio A, Belo I, Salgado JM: Mediterranean agro-industrial wastes as valuable substrates for lignocellulolytic enzymes and protein production by solid-state fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(14):5248-5256, 2018.
- Šelo G: Utjecaj dodatka sirka na aktivnost lakaze tijekom submerznog uzgoja *Trametes versicolor*. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Šelo G: Razvoj procesa biološke obrade i frakcioniranja tropa grožđa u svrhu proizvodnje fenolnih spojeva. *Disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2022.
- Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonič M, Knez Ž: Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89(2):191-198, 2005.
- Tavares APM, Coelho MAZ, Agapito MSM, Coutinho JAP, Xavier AMRB: Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134:233-248, 2006.
- Thomas L, Larroche C, Pandey A: Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81:146-161, 2013.
- Tišma M, Jurić A, Bucić-Kojić A, Panjičko M, Planinić M: Biovalorization of brewers' spent grain for the production of laccase and polyphenols. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(2):182-186, 2018.
- Tišma M, Sudar M, Vasić-Rački Đ, Zelić B: Mathematical model for *Trametes versicolor* growth in submerged cultivation. *Bioprocess Biosystems* 30: 749-758, 2010.
- Tišma M, Šalić A, Planinić M, Zelić B, Potočnik M, Šelo G, Bucić-Kojić A: Production, characterisation and immobilization of laccase for an efficient aniline-based dye decolourization. *Journal of Water Process Engineering*, 36:101327, 2020.
- Tišma M, Žnidaršič-Plazl P, Šelo G, Tolj I, Šperanda M, Bucić-Kojić A, Planinić M: *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy. State of the art, challenges and opportunities. *Bioresource Technology* 330:124997 330, 2021.
- Tišma M, Žnidaršič-Plazl P, Vasić-Rački Đ, Zelić B: Optimization of laccase production by *Trametes versicolor* cultivated on industrial waste. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166:36-46, 2012.
- Voběrková S, Solčány V, Vršanská M, Adam V: Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross-linked aggregates. *Chemosphere*, 202:694-707, 2018.
- Waterhouse AL: Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*, 6(1), I1-1, 2002.

- Xu L, Sun K, Wang F, Zhao L, Hu J, Ma H, Ding Z: Laccase production by *Trametes versicolor* in solid-state fermentation using tea residues as substrate and its application in dye decolorization. *Journal of Environmental Management*, 270:110904, 2020.
- Zeko-Pivač A, Bošnjaković A, Planinić M, Parlov Vuković J, Novak P, Jednačak T, Tišma M: Improvement of the nutraceutical profile of brewer's spent grain after treatment with *Trametes versicolor*. *Microorganisms*, 10(11):2295, 2022.
- Zeko-Pivač A, Tišma M, Žnidaršič-Plazl P, Kulisic B, Sakellaris G, Hao J, Planinić M: The potential of brewer's spent grain in the circular bioeconomy: State of the art and future perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10:870744, 2022.