

# Biovalorizacija konopljne pogače nakon obrade s *Trametes versicolor* i *Hemicula grisea*

---

Alilović, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:109:361497>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-30**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



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

**Kristina Alilović**

**BIOVALORIZACIJA KONOPLJINE POGAČE NAKON OBRADU S**  
*Trametes versicolor i Humicola grisea*

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2018.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

### Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Biotehnologija  
**Nastavni predmet:** Kemijski i biokemijski reaktori  
**Tema rada** je prihvaćena na XI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 25. rujna 2017.  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Marina Tišma*

### BIOVALORIZACIJA KONOPLJINE POGAČE NAKON OBRADE S *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*

*Kristina Alilović, 384-DI*

#### Sažetak:

Kao nusproizvod u procesu proizvodnje ulja hladnim prešanjem nastaje pogača u kojoj zaostaju određene količine ulja, a koja sadrži proteine, vlakna, mineralne tvari i druge sastojke. U ovome radu provedena je biološka obrada konopljine pogače s dva mikroorganizma, *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*, u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Analiziran je kemijski sastav konopljine pogače (udio vlakana, proteina, masti, mineralnih tvari, ukupnog organskog ugljika) prije obrade i nakon deset dana obrade. Svakodnevno su analizirane i koncentracije jednostavnih šećera u vodenim ekstraktima pogača, te su mjerene volumne aktivnosti enzima lipaze. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da nakon obrade s oba mikroorganizma dolazi do porasta udjela mineralnih tvari, proteina, ukupnog organskog ugljika i vlakana u konopljinoj pogači. No, unatoč tome što je detektirano smanjenje udjela masti, nisu zabilježene vrijednosti volumnih aktivnosti lipaza značajnije za njenu daljnju primjenu. Rezultati analize šećera ukazuju da oba mikroorganizma hidroliziraju saharozu do glukoze i fruktoze, te troše glukozu za svoj rast, te je dokazano da, za razliku od *H. grisea*, *T. versicolor* ne metabolizira fruktozu.

**Ključne riječi:** biološka obrada, konopljina pogača, *Humicola grisea*, lipaza, *Trametes versicolor*

**Rad sadrži:** 51 stranica  
14 slika  
6 tablica  
30 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Datum obrane:** 28. rujna 2018.

**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 Process engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Course title:** Chemical and biochemical reactors

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XI held on September 25, 2018.

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Marina Tišma*, PhD, associate prof.

### Biovalorization of hemp seed oil cake after biological treatment with *Trametes versicolor* and *Humicola grisea*

*Kristina Alilović*, 384-DI

#### Summary:

In the production of cold-pressed oil, a cake is made as a by-product in which certain amount of oil is left behind, but also contains proteins, fibers, minerals and other ingredients. In this work, biological treatment of hemp oil cake has been carried out with two microorganisms, *Trametes versicolor* and *Humicola grisea*, using fungal-based solid-state technology. Before and after biological treatment of hemp oil cake, the content of fibers, total proteins, ether extracts, ash and total organic carbon were analyzed. During the treatment, concentration of simple sugars in aqueous extracts of cake as well as volume activity of enzyme lipase were measured. Based on the obtained results, after biological treatment with both microorganisms, it can be concluded that the content of ash, total proteins, total organic carbon and fibers increased. Despite the fact that the content of ether extracts decreased, amounts of lipase significant for its further applications, weren't recorded. The results of sugar analysis suggest that the both microorganisms hydrolyze sucrose to glucose and fructose, and utilize glucose for its growth, whereas it is shown that, unlike *H. grisea*, *T. versicolor* doesn't metabolise fructose.

**Key words:** biological treatment, hemp seed oil cake, *Humicola grisea*, lipase, *Trametes versicolor*

**Thesis contains:** 51 pages  
14 figures  
6 tables  
30 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Sandra Budžaki</i> , PhD, associate prof.  | chair person |
| 2. <i>Marina Tišma</i> , PhD, associate prof.    | supervisor   |
| 3. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, associate prof.   | member       |
| 4. <i>Mirela Planinić</i> , PhD, associate prof. | stand-in     |

**Defense date:** September 28, 2018

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.

## ZAHVALE

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Marini Tišmi na predloženoj temi, posvećenom vremenu i poticanju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala na ljubaznosti, strpljenju i pristupačnosti u svakom trenutku.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Ivici Strelecu i izv. prof. dr. sc. Sandri Budžaki na trudu, svim savjetima i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Hvala mag. ing. proc. Goranu Miljiću i gospođi Jelki Babić te kolegama na pruženoj pomoći i posvećenom vremenu tijekom brojnih sati provedenih u laboratoriju.

Posebna zahvala mojim roditeljima i sestri na razumijevanju, strpljenju, bezuvjetnoj podršci i motivaciji tijekom studiranja.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. Lipaze .....	4
2.2. Proizvodnja lipaze tijekom uzgoja mikroorganizama na čvrstim nosačima .....	5
2.2.1. Uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima .....	6
2.2.2. <i>Trametes versicolor</i> .....	7
2.2.3. <i>Humicola grisea</i> .....	8
2.3. Vrste lignoceluloznog materijala i mogućnosti njihovog iskorištenja .....	8
2.3.1. Nusproizvodi proizvodnje hladno-prešanog ulja.....	11
2.3.2. Karakteristike konopljinine pogače .....	12
2.4. Biovalorizacija lignoceluloznog otpada .....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>15</b>
3.1. ZADATAK .....	16
3.2. MATERIJALI.....	16
3.2.1. Mikroorganizmi .....	16
3.2.2. Supstrat .....	16
3.2.3. Popis kemikalija.....	16
3.2.4. Aparatura .....	17
3.3. METODE .....	20
3.3.1. Priprema hranjive podloge za uzgoj radnih mikroorganizama .....	20
3.3.2. Uzgoj <i>Trametes versicolor</i> i <i>Humicola grisea</i> u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (biološka obrada konopljinine pogače) .....	20
3.3.3. Određivanje udjela vode i mineralnih tvari.....	22
3.3.4. Određivanje udjela masti po Soxhletu .....	22
3.3.5. Određivanje koncentracije ukupnih proteina po Kjeldahl-u .....	23
3.3.6. Određivanje udjela neutralnih detergent vlakana prema Van Soest-u.....	24
3.3.7. Određivanje udjela kiselih detergent vlakana prema Van Soest-u .....	24
3.3.8. Određivanje udjela kiselog detergenta lignina prema Van Soest-u .....	25
3.3.9. Određivanje udjela ukupnog ugljika, anorganskog ugljika i ukupnog organskog ugljika .....	26
3.3.10. Određivanje koncentracije šećera u ekstraktima iz konopljinine pogače HPLC metodom .....	27
3.3.11. Mjerenje volumne aktivnosti enzima lipaza.....	28
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>32</b>
4.1. Analiza kemijskog sastava konopljinine pogače prije i nakon biološke obrade s <i>Trametes versicolor</i> .....	33
4.2. Analiza kemijskog sastava konopljinine pogače prije i nakon biološke obrade s <i>Humicola grisea</i> .....	34
4.3. Rezultati aktivnosti lipaze tijekom uzgoja <i>Trametes versicolor</i> i <i>Humicola grisea</i> na konopljinoj pogači..	35
4.4. Rezultati masenih udjela šećera u ekstraktima konopljinine pogače tijekom biološke obrade s <i>Trametes versicolor</i> i <i>Humicola grisea</i> .....	36
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>41</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>43</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

### OZNAKE:

$c$	masena koncentracija analizirane tvari u ekstraktu ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )
$C$	maseni udio analizirane tvari u ekstraktu ( $\text{mg}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ )
$d$	promjer kivete (cm)
$T$	temperatura ekstrakcije ( $^{\circ}\text{C}$ )
$t$	vrijeme (min)
$V.A.$	volumna aktivnost enzima ( $\text{U}/\text{dm}^3$ )
$V_{uk}$	ukupni volumen reakcijske smjese ( $\text{cm}^3$ )
$V_{uzorak}$	volumen uzorka dodanog u test ( $\text{cm}^3$ )

### KRATICE:

$A_{GP}$	apsorbancija glavne probe
$A_{KE}$	apsorbancija kontrole ekstrakta
$A_{KRS}$	apsorbancija kontrole raspada supstrata
$D_f$	faktor razrjeđenja ( <i>eng. dilution factor</i> )
IC	anorganski ugljik
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
PB	fosfatni pufer ( <i>eng. phosphate buffer</i> )
PDA	krumpirov agar ( <i>eng. potato dextrose agar</i> )
PMMA	polimetil metakrilat
SmF	submerzna fermentacija ( <i>eng. Submerged fermentation</i> )
SSF	fermentacija na čvrstim nosačima ( <i>eng. Solid state fermentation</i> )
TC	ukupni ugljik
TOC	ukupni organski ugljik
U	međunarodna jedinica enzimске aktivnosti ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )

### SIMBOLI:

$\epsilon$	molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{cm}^3/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$ )
------------	--

## **1. UVOD**



Lignocelulozni otpad porijeklom iz različitih industrija predstavlja dobru sirovinu za proizvodnju biogoriva te nekih visokovrijednih produkata. Kako bi se potencijal svih kemijskih sastavnica lignoceluloznog materijala za proizvodnju tih produkata mogao ostvariti, potrebno je svladati njegovu otpornost prema razgradnji do jednostavnih monomera. Postoji nekoliko mikroorganizama koji mogu razgraditi osnovne sastojke lignocelulozne biomase (lignin, celulozu i hemicelulozu), a najviše se u znanstvenim istraživanjima u tu svrhu upotrebljavaju gljive bijelog truljenja. Ove gljive proizvode lignolitičke enzime, primjerice lignin-peroksidazu, mangan-peroksidazu i lakazu, a jedna od metoda njihovog uzgoja je fermentacija na čvrstim nosačima, pri čemu se kao supstrati, mogu koristiti lignocelulozni materijali kao što su pivski trop, lišće, stabljike, šećerna trska, žetveni ostatci žitarica, te uljne pogače odnosno nusproizvodi u proizvodnji ulja.

Zbog visokog udjela proteina, dijetalnih vlakana i ostalih bioaktivnih spojeva, koji imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje, pogače su postale zanimljiva sirovina za daljnju primjenu u prehrambenoj industriji.

Cilj ovog istraživanja je bio istražiti mogućnost unaprjeđenja nutritivnog sastava konopljine pogače primjenom metode biološke obrade koristeći dva mikroorganizma, *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*, te istražiti mogućnost proizvodnje lipaze tijekom uzgoja ova dva mikroorganizma na konopljinoj pogači.

Istraživanje (eksperimentalni dio rada) proveden je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek, u Laboratoriju za procesno inženjerstvo.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Lipaze

Lipaze (triacilglicerolester hidrolaze EC 3.1.1.3.) su važni enzimi u industrijskoj proizvodnji. Kataliziraju reakcije hidrolize triacilglicerola u masne kiseline i glicerol, te reakcije esterifikacije i transesterifikacije. Lipaze imaju sve veću primjenu u industriji masti i ulja, mliječnoj industriji za hidrolizu mliječne masti te kao aditivi u hrani (modifikacija okusa). Nadalje, primjenjuju se u obradi otpadnih voda za uklanjanje masnoća, u proizvodnji deterdženata, u kožarskoj industriji u procesima odmaščivanja kože, te kozmetičkoj industriji. Također, lipaze imaju važnu ulogu u proizvodnji biodizela (Ognjanović i sur., 2009; Salihu i sur., 2012).

Lipaze su do sada izolirane iz mnogih vrsta životinja, biljaka i mikroorganizama, no najveći biotehnološki značaj imaju upravo mikrobne lipaze zbog niza prednosti kao što je na primjer mogućnost rasta mikroorganizama na jeftinim hranjivim podlogama uz minimalan utrošak energije, pri blagim procesnim uvjetima temperature i pH. Lipaze su najčešće izolirane iz kvasaca i plijesni, primjerice *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*. Bakterije, u odnosu na kvasce i plijesni, su manje poznati proizvođači lipaza (Ognjanović i sur., 2009), a poznate su sljedeće vrste bakterija koje proizvode lipazu: *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus sphaericus* (Salihu i sur., 2012).

Jedna od važnih osobina lipaza je selektivnost, na kojoj se temelji njihova praktična primjena pa je pravilnim izborom enzima moguće usmjereno odvijanje reakcija i dobivanje čistog produkta u velikom prinosu. Lipaze pokazuju specifičnost u odnosu na masne kiseline, ester, specifičnost položaja i stehiometrijsku specifičnost. Također, lipaze imaju karakterističan mehanizam djelovanja (aktivne su na granici faza) u stvaranju kompleksa enzim-supstrat gdje se molekula lipaze postavlja u položaj otvorene konformacije i tako aktivni centar lipaze postaje dostupan za molekule supstrata (Ognjanović i sur., 2009).

Unatoč brojnim znanstvenim radovima u kojima su dane mogućnosti tijekom uzgoja filamentoznih gljiva u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, postoje brojni izazovi za primjenu lipaza kao biokatalizatora u industrijskoj proizvodnji. Stoga se ova područja primjene lipaza još uvijek istražuju kako bih se pronašla najbolja kombinacija izbora mikroorganizma, supstrata te procesnih uvjeta.

## 2.2. Proizvodnja lipaze tijekom uzgoja mikroorganizama na čvrstim nosačima

Mnogi mikroorganizmi proizvode lipaze tijekom rasta na složenim organskim materijalima. Izolacija i identifikacija novih mikroorganizama sa različitih staništa, uključujući ostatke biljnih ulja i mliječnih proizvoda, ukazuje na to da postoji veliki potencijal za pronalaskom i proizvodnjom novih vrsta lipaza. Proizvodnju lipaze visokih aktivnosti u velikoj mjeri ovisi o izboru radnog mikroorganizma, procesnim uvjetima (pH, temperatura), strukturi supstrata, te dizajnu bioreaktora. Mikrobne lipaze su uglavnom ekstracelularne, a najčešće su izolirane iz mezofilnih i termofilnih mikroorganizama pri temperaturama uzgoja od 35-50 °C i 60-80 °C (Christopher i sur., 2014; Salihu i sur., 2012). U **Tablici 1.** prikazani su rezultati istraživanja iz literature o mogućnostima primjene različitih mikroorganizama u svrhu proizvodnje lipaze tijekom uzgoja na različitim supstratima.

**Tablica 1.** Prikaz supstrata i mikroorganizama u proizvodnji lipaze (Salihu i sur., 2012)

Vrsta organizma	Radni mikroorganizam	Supstrat	Aktivnost lipaze
<b>Gljive</b>	<i>Aspergillus niger</i>	Sojina pogača	25,22 U/g
		Pšenične mekinje	33,03 U/g; 630 U/g
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Pšenične mekinje	24,45 U/g; 96,52 U/g
	<i>Penicillium simplicissimum P.</i>	Sezamova pogača	363,6 U/g
Ricinusova pogača		155,8 U/g	
<b>Bakterije</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pogača od sjemenki	1084 U/g
		Jatrophe	
<b>Plijesni</b>	<i>Candida cylindracea</i>	Otpadne struje iz proizvodnje maslinovog ulja	9,23 U/cm <sup>3</sup> ; 20,4 U/cm <sup>3</sup>
		Otpadne struje iz proizvodnje palminog ulja	20,26 U/cm <sup>3</sup>

### 2.2.1. Uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Uzgoj mikroorganizama na čvrstim nosačima (eng. *Solid-state fermentation*, SSF) je proces koji se provodi u odsutnosti slobodne vode na materijalu koji je netopljiv. Čvrsti nosači mogu biti inertni (npr. sintetički materijali) i neinertni (npr. lignocelulozni materijali), a djeluju kao fizički nosači za mikroorganizme i/ili služe kao izvor hranjivih tvari. Mikrobna razgradnja može se odvijati i submerzno, odnosno u tekućoj podlozi (eng. *Submerged fermentation*, SmF), a glavna razlika između SSF i SmF je u količini slobodne vode u supstratu. Prednosti fermentacije na čvrstim nosačima, u odnosu na submerznu, su veći prinosi konačnih produkata, manja mogućnost kontaminacije, upotreba otpada kao supstrata, niža cijena opreme, manje količine otpadne vode u procesima, itd. (Pandey i sur., 1999). Nedostaci ovog procesa su heterogenost sustava što dovodi do problema prijenosa tvari i topline, otežane kontrole procesa, te poteškoća pri uvećanju mjerila. Supstrati koji se najčešće koriste su nusproizvodi ili otpadi iz poljoprivredne, prehrambene i šumarske industrije poput žetvenih ostataka različitih žitarica, repinih rezanaca, uljnih pogača, komina nastalih preradom voća i povrća, itd.

Pri uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima, za razvoj uspješnog bioprocesa, važno je uzeti u obzir nekoliko čimbenika. Potrebno je odabrati odgovarajuću podlogu, veličinu čestica supstrata, radni mikroorganizam, te optimalne procesne uvjete temperature i vremena trajanja procesa, pH supstrata, vlažnost supstrata, brzinu protoka zraka, itd. (Isroi i sur., 2011; Pandey i sur., 1999; 2000). Sitne čestice supstrata imaju veću dostupnu površinu za rast mikroorganizama, dok jako sitne čestice mogu uzrokovati aglomeraciju supstrata što može dovesti do otežanog rasta mikroorganizama. Dodatno, upotrebom krupnijih čestica osiguran je bolji prijenos kisika. (Pandey i sur., 2000).

Mikroorganizmi koji se najčešće koriste u ovim procesima su filamentozne gljive, kao što su primjerice gljive bijelog truljenja, jer oponašaju uvjete rasta iz prirodnog okoliša, a svojim hifama mogu kolonizirati čvrste podloge na površinama supstrata ili mogu prodrijeti u prostore između čestica supstrata.

U posljednjim desetljećima, interes za SSF tehnologijom se značajno povećao, a istraživanja koja se provode dovela su do nastanka različitih proizvoda:

- enzima (lipaze, proteaze, celulaze, amilaze);
- pigmenta;

- tvari arome;
- kemikalija (etanol, mliječna kiselina, limunska kiselina);
- proteinski obogaćenih krmiva;
- antibiotika (penicilin, oksitetraciklin);
- inokuluma spora *Penicillium roqueforti* za proizvodnju plavog sira.

Također, provedena su istraživanja u kojima se mikroorganizmi, u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, koriste za procese bioremedijacije, kompostiranja, proizvodnje goriva, detoksikacije ostataka iz poljoprivredne industrije, biorazgradnje opasnih tvari, itd. (Mitchell i sur., 2006; Pandey i sur., 2000).

### **2.2.2. *Trametes versicolor***

*Trametes versicolor*, poznata pod nazivima „puranov rep“ i „šarena tvrdokoška“, gljiva je bijelog truljenja koja pripada skupini *Basidiomycetes*. Ova gljiva je široko rasprostranjena u prirodi, a razmnožava se na deblima, stabljikama i odumrlim dijelovima drveća u različitim formacijama i bojama (Krnić, 2017).

Gljive bijelog truljenja u prirodi uzrokuju truljenje drveta na dva načina, simultanom razgradnjom svih polimera u drvetu ili selektivnom razgradnjom lignina u drvetu. U simultanoj razgradnji (*Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius*), različiti enzimi istovremeno kataliziraju razgradnju približno jednake količine lignina, celuloze i hemiceluloze, dok selektivnim procesom razgradnje (*Dichomitus squalens*, *Ceriporiopsis subvermispora*) enzimi kataliziraju razgradnju lignina i hemiceluloze bez značajnije razgradnje celuloze (Gold i sur., 1993; Isroi i sur., 2011).

*Trametes versicolor* proizvodi lignolitičke enzime, primjerice mangan peroksidazu, celulazu, lignin peroksidazu, avicelulazu, a ponajviše lakazu. Lignolitički enzimi kataliziraju degradaciju glavnih komponenata drva (celuloze, lignina, hemiceluloze), policikličkih aromatskih ugljikovodika, polikloriranih bifenila i brojnih sintetskih boja. *Trametes versicolor* se često upotrebljava i u medicini za proizvodnju polisaharida koji inhibiraju rast stanica raka, replikaciju virusa HIV-a, a poznato je da pomaže u oporavku jetre od gama zračenja te stimulira imunološki sustav. Može se primjenjivati u procesima delignifikacije i izbjeljivanju kraft pulpe, što predstavlja ekološki prihvatljivu tehnologiju u industriji papira. Također, upotrebljava se i

u procesima proizvodnje biogoriva (kao jedna od bioloških metoda predobrade lignoceluloznih materijala) te u obradi otpadnih voda (Isroi i sur., 2011; Webster i Weber, 2007; Xavier i sur. 2007).

### **2.2.3. *Humicola grisea***

*Humicola grisea* je termofilna gljiva koja ima složeni sustav hidrolitičkih enzima (endoglukanaze, glukoamilaze, ksilanaze,  $\beta$ -glukozidaze, feruol esteraze i trehalaze), te predstavlja značajan potencijal za biokonverziju različitih vrsta otpada. Provedena su brojna istraživanja hidrolitičkih enzima i njihove primjene u saharifikacije lignoceluloze, tijekom uzgoja *Humicola grisea* na različitim vrstama supstrata, poput šećerne trske, pšeničnih mekinja, slame, itd. Enzimi izolirani iz kulture *H. grisea* korišteni su za izbjeljivanje pulpe u proizvodnji papira iz eukaliptusa tijekom sulfatnog (kraft) procesa. Ova termofilna gljiva pokazuje sve veći interes znanstvenika za istraživanje njezinih karakteristika u industrijskim procesima (Satyanarayana i sur. 2013).

## **2.3. Vrste lignoceluloznog materijala i mogućnosti njihovog iskorištenja**

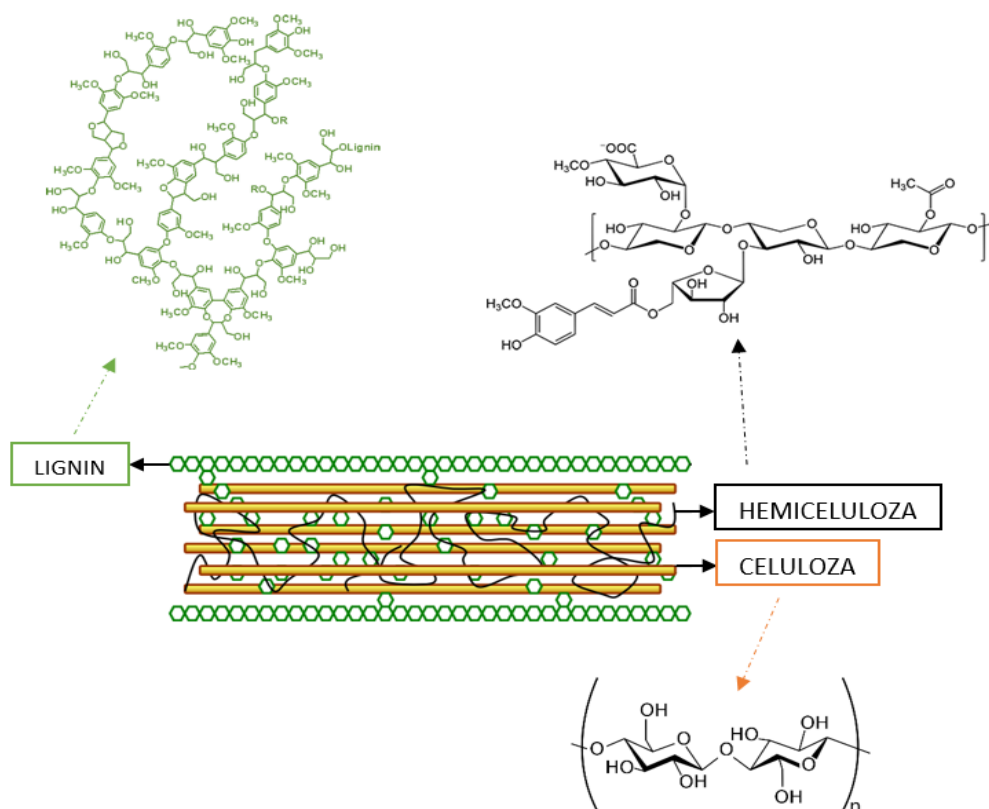
Lignocelulozni materijali kao što su agro-industrijski, poljoprivredni i šumarski otpad predstavljaju jeftin i obnovljiv izvor energije. Ovakav otpad uključuje razne materijale poput piljevine, topole, šećerne trske, otpadnog papira, pivskog tropa, lišća, stabljike, ljuske, žitarica (riža, kukuruz, sirak, ječam) te se akumulira svake godine u velikim količinama, uzrokujući probleme u okolišu, ali i gubitke potencijalno vrijednih sirovina (Mussato i sur., 2010). U **Tablici 2.** prikazani su primjeri upotrebe različitih lignoceluloznih materijala u svrhu proizvodnje nekih industrijski važnih produkata.

**Tablica 2.** Primjena lignoceluloznih materijala kao supstrata u proizvodnji industrijski važnih produkata (Koyani i sur., 2015)

SUPSTRAT	MIKROORGANIZAM	PRODUKT
Pšenična slama	<i>Trametes versicolor</i> , <i>Trametes multicolour</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i>	Mangan-peroksidaza, lignin-peroksidaza i lakaza
Kore od banane	<i>Bacterial consortia</i>	Celulaza
Šećerna trska, sojina pogača	<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipaza
Stabljika gorušice	<i>Termitomyces clypeatus</i>	Ksilanaza
Kore od naranče, limuna, jabuke	<i>Aspergillus niger</i>	Pektinaza
Nusproizvodi od kave, pšenične mekinje	<i>Aspergillus oryzae</i>	Proteaza
Kukuruzova pogača	<i>Monascus purpureus</i>	Prirodni pigmenti
Sirak	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol
Sjemenke suncokreta	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Biosurfaktanti
Sjemenke manga	<i>Monascus purpureus</i>	Bioaktivni metaboliti
Ljuske indijskog oraha	<i>Aspergillus oryzae</i>	Galna kiselina
Ostaci od manioke, palme	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Tvari arome (esteri)
Kokosova pogača	<i>Aspergillus niger</i>	Metilketoni

Općenito, lignocelulozna biomasa sastoji se od tri grupe polimera: celuloze, hemiceluloze i lignina koji su međusobno povezani u čvrstu strukturu te čine oko 90% suhe tvari lignoceluloze. Ostatak čine pepeo, elementi u tragovima (dušik, sumpor, klor, metali) i ekstraktivne tvari (Kumar i sur., 2016). Na **Slici 1.** prikazane su osnovne frakcije lignocelulozne biomase. Celuloza je osnovna komponenta stanične stijenke u lignoceluloznoj strukturi koja je odgovorna za čvrstoću i kemijsku stabilnost biljke (Shahzadi i sur., 2014). Linearni je homopolisaharid izgrađen od ponovljenih jedinica celobioze (dvije glukoze povezane  $\beta$ -(1,4) glikozidnom vezom). Molekule celuloze povezane su vodikovim vezama te se nakupljaju u skupine koje se nazivaju mikrofibrili. Celulozni mikrofibrili tvore kristalične strukture (oko 2/3 ukupne celuloze) koje su rezistentnije na hidrolizu i amorfne su strukture, te su manje zastupljenije u molekuli (Mussato i sur., 2010).





**Slika 1.** Prikaz frakcija lignina, celuloze i hemiceluloze u strukturi lignoceluloze

Celuloza je netopljiva u organskim otapalima i vodi. Danas se celulozni ostaci prerađuju mikrobnim procesima u proteinska krmiva i etanol, a najčešći materijali koji se u tu svrhu upotrebljavaju su piljevine bjelogoričnog i crnogoričnog drva, te žetveni ostaci (Nađ, 2014).

Hemiceluloza je linearni, razgranati heteropolimer koji se tipično sastoji od pet različitih šećera (arabinoze, galaktoze, glukoze, manoze, ksiloze) i šećernih kiselina, a nalazi se u drvetu i biljnim tkivima. Manje je molekularne mase od celuloze, a njezina razgranata i amorfna građa čine ju vrlo podložnom hidrolizi. Danas su istraživanja usmjerena na biokonverziju hemiceluloznih šećera iz kojih se mogu dobiti etanol, butanol, ksilitol, 2,3-butilen glikol, mliječna kiselina, a izvori su poljoprivredni otpad (Mussato i sur. 2010).

Lignin je složena molekula sastavljena od fenilpropanskih jedinica koje su organizirane u veliku trodimenzionalnu strukturu te je vrlo otporna na kemijsku i enzimsku razgradnju. Pruža čvrstoću biljnoj strukturi, otpornost i nepropusnost prema mikroorganizmima, te oksidativnom stresu. Zbog svoje heterogene i amorfne strukture predstavlja kompleksnu molekulu i tvori kompleks s hemicelulozom enkapsulirajući celulozu (Mussato i sur., 2010).

### 2.3.1. Nusproizvodi proizvodnje hladno-prešanog ulja

Nakon procesa proizvodnje hladnog prešanja ulja (suncokretovog, uljane repice, lana, konoplje i dr.), kao nusproizvod, nastaju pogače. Ovim procesom, bilo da se provodi ekstrakcijom pomoću otapala ili mehaničkim putem uz primjenu tlaka, stvara se značajna količina otpada koja se sastoji od ljusaka, sjemenki, odmašćene pogače i uljnog mulja. Pogače sadrže niz vrijednih sastojaka od kojih su najvažniji proteini. Od ostalih komponenata prisutni su ugljikohidrati, lipidi, dijetalna vlakna, celuloza, mineralne tvari i vitamini. Zbog visokog sadržaja proteina, pogače se koriste u ishrani životinja poput svinja, peradi i ribe ili se upotrebljavaju kao gnojivo (Pojić i sur., 2014; Ramachandran i sur., 2006).

Cozea i sur. (2016.) navode podjelu pogača na 2 skupine: jestive i nejestive. Nejestive pogače, dobivene primjerice iz biljaka nim (*Azadirachta indica*) i karanja (*Millettia pinnata*), se koriste kao organska gnojiva zbog visokog udjela dušika, fosfora i kalija. Otkriveno je da neke od tih pogača pospješuju unos dušika biljke, usporavaju nitrifikaciju tla, te štite biljke od insekata i parazita u tlu.

Jestive pogače imaju visoku nutritivnu vrijednost gdje sadržaj proteina varira između 15 i 50%, a sastav ovisi o vrsti uljarice, metodi dobivanja i uvjetima skladištenja. Mogu se koristiti kao proteinski dodaci u ljudskoj prehrani, kao brašno ili se mogu dodavati drugim vrstama brašna. Obogaćeno brašno se može koristiti u proizvodnji hrane bez glutena pri čemu se povećava nutritivna vrijednost proizvoda, a kao dodaci u prehrani imaju pozitivan utjecaj na zdravlje i mogu smanjiti rizik od nekih bolesti.

Osim navedenih primjena, uljne pogače se mogu koristiti kao supstrati u proizvodnji enzima poput lipaza i celulaza, ili u proizvodnji antibiotika, vitamina, antioksidanata, aminokiselina, organskih kiselina, biološki aktivnih sekundarnih metabolita itd.

Među najpoznatijim pogačama, koju su svoju primjenu našle u biotehnologiji, navode se pogača suncokreta, sezamova pogača, pogača konoplje, kokosova pogača, pogača masline, pogače lana, pogača pamuka, soje i uljane repice.

U proizvodnji enzima lipaze, najviše se koristi kokosova pogača. Osim kokosove pogače, za proizvodnju enzima poput amilaze, glukoamilaze, fitaze i proteaze koriste se još i pogača masline te sezamova pogača. Pogače suncokreta se koriste i u proizvodnji antibiotika.

Biološkom obradom sezamove pogače s *Bacillus circulans* dobivaju se snažni antioksidacijski spojevi poput glikozida (Ramachandran i sur., 2006).

### 2.3.2. Karakteristike konopljne pogače

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) je biljka koja već tisućama godina predstavlja važan izvor hrane u kulturama diljem svijeta, te se upotrebljava za liječenje raznih bolesti u tradicionalnoj medicini. Vrste kanabisa koje ne služe kao lijek, nazivaju se konopljom i posljednjih godina privlače sve veći interes kao nutritivno vrijedna sirovina (House i sur., 2010).

Općenito, sjemenke industrijske konoplje sadrže otprilike 33-34% ulja, oko 25% proteina, te značajne količine dijetalnih vlakana, vitamina i minerala. Ulje iz sjemenke sadrži više od 80% polinezasićenih masnih kiselina, a posebno je bogato linolnom (*omega-6*), alfa-linolenskom (*omega-3*), oleinskom i palmitinskom kiselinom. Omjer *omega-6* i *omega-3* u ulju konoplje je 2:1 i 3:1 što se smatra optimalnim za zdravlje ljudi. Osim toga, sadrži visoki udio esencijalnih masnih kiselina koje ljudski organizam ne može sam sintetizirati pa ih je potrebno unositi putem hrane. U konoplji se također nalaze dva visokokvalitetna proteina, albumin i edestin, koja se lako probavljaju. Sjeme konoplje ne sadrži gluten pa se može koristiti kao izvor biljnih proteina u proizvodnji brašna. Od vitamina i minerala koji ulaze u sastav treba spomenuti vitamine B kompleksa i vitamin E, te Ca, Mg, Na, K, Mn, P, Fe, Zn i Cu (Pojić i sur. 2014.; Vujasinović i sur, 2012).

Ulje od konoplje je zelene boje, orašastog mirisa i okusa, a dobiva se postupkom hladnog prešanja sjemenki industrijske konoplje. Konopljna pogača je nusproizvod koji zaostaje nakon prešanja sjemenki konoplje. Visoko kvalitetna pogača donedavno se smatrala otpadom i beskorisnim ostatkom, a danas privlači interes znanstvene zajednice i industrije jer se može iskoristiti za dobivanje obnovljivih izvora energije te kao osnovna sirovina za proizvodnju visokovrijednih produkata. Pogača sadrži visoki udio proteina, oko 30 do 50 %, te se uglavnom koristi kao stočna hrana ili proteinski suplement u pekarskim proizvodima i piću. (House i sur., 2010; Vujasinović i sur, 2012).

U **Tablici 3.** je dan sastav pogače konoplje na temelju pregledane literature.

**Tablica 3.** Kemijski sastav pogače konoplje - literaturne vrijednosti

PARAMETAR	House i sur., 2010.	House i sur., 2012.	Pojić i sur., 2014.	Cozea i sur., 2016.	Vujasinović i sur., 2012.
<b>Suha tvar</b>	8,5 %	1,2 – 8,1 %	7,88 %	-	5 %
<b>Pepeo</b>	6,70 % s.t.	4,6 – 8,7 % s.t.	6,74 % s.t.	-	7 %
<b>Proteini</b>	*40,7 % s.t.	31,0 – 53,3 % s.t.	27,9 % s.t.	24,86 % s.t.	34 %
<b>Sirova vlakna</b>	-	-	17,3 % s.t.	-	-
<b>Neutralna detergent vlakna (NDF)</b>	30,5 % s.t.	19,0 – 41,5 % s.t.	-	-	-
<b>Kisela detergent vlakna (ADF)</b>	21,5 %	12,4 – 32%	-	-	-
<b>Ukupni ugljikohidrati</b>	-	-	**1,49 % s.t.	13,04 % s.t.	-
<b>Masti</b>	10,2 % s.t.	8,4 – 11,9 % s.t.	11,8 % s.t.	5,18 % s.t.	11 %

\*N × 6,25; \*\*topivi šećeri

## 2.4. Biovalorizacija lignoceluloznog otpada

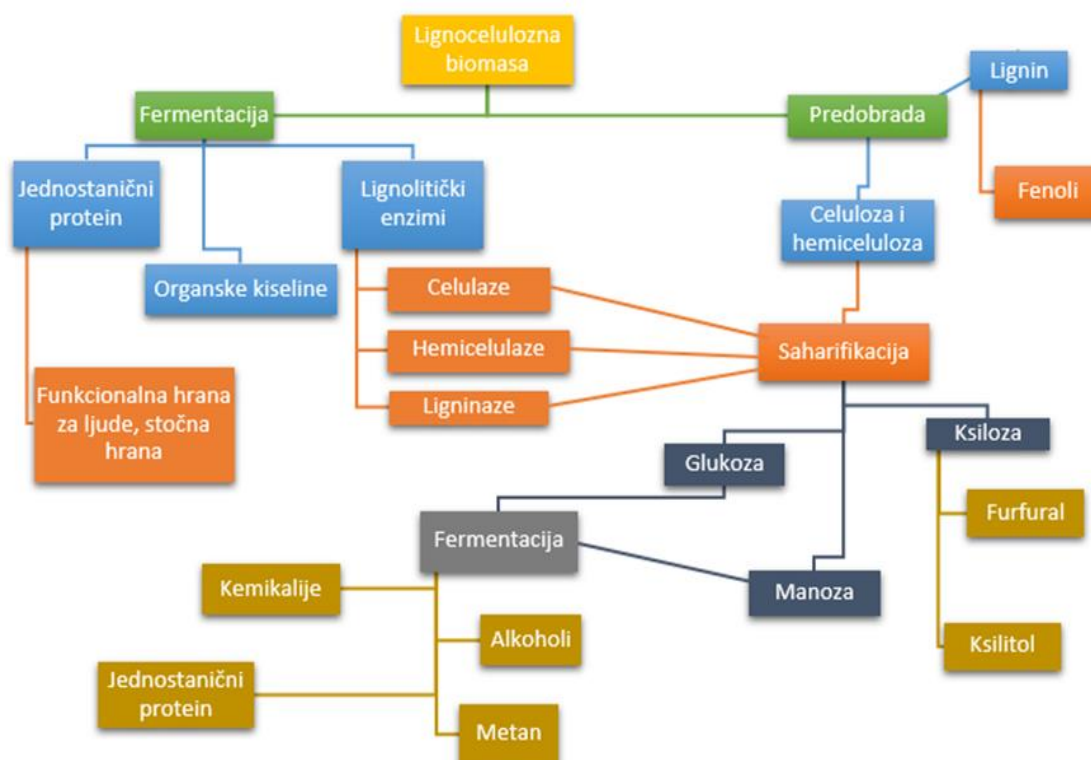
Nastanak prehrambenog otpada obuhvaća cijeli životni ciklus hrane, od uzgoja osnovnih sirovina (poljoprivreda) do industrijske prerade i proizvodnje željenog produkta, maloprodaje, potrošnje u kućanstvima, te nastanka otpada i njegovog odlaganja, zbrinjavanja ili uporabe. U razvijenim zemljama, 42% ostataka hrane dolazi iz kućanstava, dok se u prehrambenoj industriji bilježi 39%, a u sektoru prehrambenih djelatnosti 14%. Preostalih 5% odnosi se na maloprodaju i distribuciju. U Europskoj uniji se promovira prevencija stvaranja ostataka ekoinovativnim konceptom „zero waste“, tj. metodi „nultog otpada“ gdje bih se ostaci koristili kao sirovine za nove proizvode (Mirabella i sur., 2014).

Biovalorizacija je relativno nov koncept upravljanja nusproizvodima iz prehrambene industrije, a lignocelulozni materijali se mogu opisati kao jedni od najperspektivnijih prirodnih i obnovljivih izvora sirovina dostupni za doradu i preradu (Iqbal i sur., 2013).

Ostaci nakon proizvodnje biljnih ulja bogati su korisnim tvarima kao što su polifenoli, fitosteroli, karotenoidi, tokoferoli, masne kiseline, te proteini. Stoga mogu imati primjenu u tehnološkim procesima (bojenje), mogu se primjenjivati za poboljšanje nutritivnih svojstava

(obogaćivanje hrane vitaminima i mineralima), a neosporna je i njihova zdravstvena uloga s obzirom na prisustvo bioaktivnih spojeva koji imaju antioksidacijska svojstva. Također, mogu poslužiti kao dobar izvor antimikrobnih spojeva u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Malešević, 2016).

Na **Slici 2.** prikazane su mogućnosti iskorištenja lignoceluloznih materijala u različite produkte.



**Slika 2.** Biokonverzija lignocelulozne biomase u visokovrijedne produkte

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je:

- a) Analizirati kemijski sastav pogače nakon biološke obrade s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* u svrhu mogućeg iskorištavanja za proizvodnju korisnih bioprodukata
- b) Proizvesti enzim lipazu biološkom obradom konopljinke pogače s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* u uvjetima uzgoja na čvrstim nosačima

### 3.2. MATERIJALI

#### 3.2.1. Mikroorganizmi

Kao mikroorganizmi za biološku obradu konopljinke pogače 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).

#### 3.2.2. Supstrat

Kao supstrat korištena je konopljina pogača s „Obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva Lazić“ (Vraneševci, Hrvatska) dobivena nakon procesa proizvodnje hladno prešanog ulja.

#### 3.2.3. Popis kemikalija

Tijekom eksperimentalnog dijela rada korištene su sljedeće kemikalije:

- 2-etoksietanol,  $C_4H_{10}O_2$ , (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Njemačka);
- 2-propanol (ALKALOID, Skopje, Makedonija);
- aceton (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska);
- arapska guma, prah (ACROS ORGANICS, UK);
- bakar (II) sulfat pentahidrat,  $CuSO_4 \times 5H_2O$  (ALKALOID AD, Skopje, Makedonija);
- Bradford reagens (BioRad, Njemačka);
- cetiltrimetilamonij bromid,  $C_{19}H_{42}BrN$  (ACROS-ORGANICS, New Jersey, USA);

- dinatrijev fosfat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (ACROS-ORGANICS, New Jersey, USA);
- fosforna kiselina (85 %),  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- izoamilni alkohol (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- kalijev dihidrogenfosfat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- kalijev hidrogenfosfat,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (GRAM-MOL d.o.o. Zagreb, Hrvatska);
- kloroform (Carlo Erba, Francuska);
- klorovodična kiselina,  $\text{HCl}$  (CARLO ERBA Reagents, Rodano, Italija);
- kompleksal III,  $\text{C}_4\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \times \text{H}_2\text{O}$  (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- krumpirov agar (Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza, Milan, Italija);
- n-oktanol (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Njemačka);
- natrij borat dekahidrat,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$  (ACROS-ORGANICS, New Jersey, USA);
- natrijev lauril fosfat,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$  (ACROS-ORGANICS, New Jersey, USA);
- natrijev sulfat bezvodni,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska);
- *p*-nitrofenil palmitat, *p*NPP (Alfa Aesar, Njemačka);
- petroleter (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- sumporna kiselina,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska);
- Tris – baza,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$  (ACROS ORGANICS, USA);

### 3.2.4. Aparatura

Udio suhe tvari u uzorcima određen je termogravimetrijskom metodom na uređaju za radijacijsko infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo), prikazanim na **Slici 3**.



**Slika 3.** HR-73, Mettler Toledo



Za usitnjavanje uzoraka potrebnih za određivanje koncentracije šećera u ekstraktima iz konopljine pogače korišten je ultracentrifugalni mlin (Retsch ZM 200) prikazan na **Slici 4**.



**Slika 4.** Ultracentrifugalni mlin

Za određivanje udjela vlakana u uzorcima prije i nakon biološke obrade konopljine pogače s *T. versicolor* i *H. grisea* korišten je uređaj (VELP, 2015) prikazan na **Slici 5**.



**Slika 5.** Uređaj za određivanje vlakana (VELP)

Za određivanje udjela ukupnog organskog ugljika (TOC), anorganskog ugljika (IC) i ukupnog ugljika (TC) korišten je TOC analizator (SSM-5000A Shimadzu, 2011.) prikazan na **Slici 6**.



**Slika 6.** Shimadzu TOC analizator

Određivanje masenih udjela šećera (glukoze, fruktoze, saharoze, maltoze i maltotrioze) provedeno je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti te je korišten uređaj (Nexera XR UHPLC, Shimadzu) prikazan na **Slici 7**. Uređaj se sastoji od vakuum otplinjača (DGU-20A<sub>5R</sub>), 2 binarne pumpe (LC-20ADXR), automatskog uzorkivača (SIL-20ACXR), kolonske pećnice (CTO-20AC), PDA detektora (SPD-M20A), detektora indeksa loma (RID-20A), kontrolera (CBM-20A), računala te odgovarajućeg softvera za upravljanje i sustava za obradu podataka (*LabSolution*).



**Slika 7.** Nexera XR UHPLC, Shimadzu

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Priprema hranjive podloge za uzgoj radnih mikroorganizama

Hranjiva podloga za uzgoj kultura pripremljena je tako što je izvagano 21 g krumpirovog agara i dodano 500 cm<sup>3</sup> destilirane vode. Otopina je zagrijana do vrenja te sterilizirana u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd) na 121 °C pod tlakom od 1 do 2 bara. Podloga je potom ohlađena na temperaturu od 45 °C do 50 °C, dobro promiješana i prelivena u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice. Na pripremljene hranjive podloge, u sterilnim uvjetima, naciepljeni su radni mikroorganizmi, a inkubacija je trajala 7 dana pri temperaturama od 27 °C (za uzgoj *T. versicolor*) i 45 °C (za uzgoj *Humicola grisea*).

#### 3.3.2. Uzgoj *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (biološka obrada konopljinog pogače)

Za rast biomase potrebno je osigurati optimalnu vlažnost supstrata koja za *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* iznosi od 60 % do 80 %. Nakon izmjerene vrijednosti početne vlažnosti konopljinog pogače (7,08 %) izračunato je te nezavisnim mjerenjima potvrđeno da je za postizanje 60 % vlažnosti materijala potrebno dodati 66,2 cm<sup>3</sup> vode.

Volumen vode koji je potrebno dodati uz uzorak pogače za postizanje željene vlažnosti izračunat je prema sljedećoj formuli (1):

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

gdje je:  $m_{uz}$  – masa uzorka (g)

$w_1$  – udio suhe tvari u uzorku (%)

$w_2$  – željeni udio suhe tvari u uzorku (%)

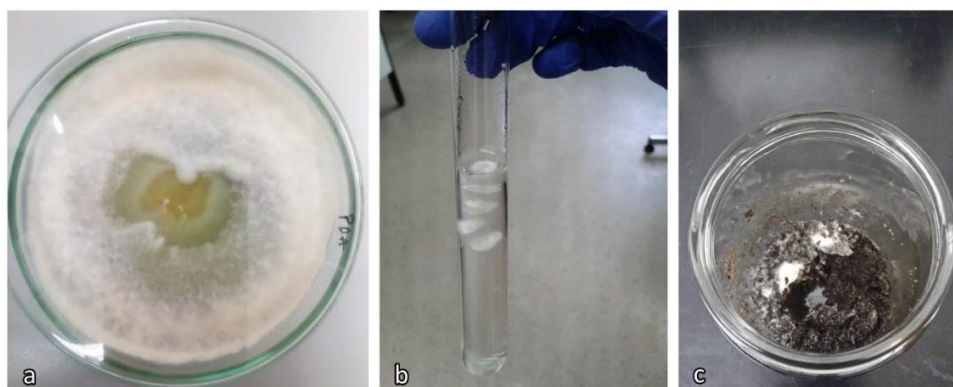
U laboratorijske teglice izvagano je 50 g konopljinog pogače (supstrat) i dodano 56,2 cm<sup>3</sup> destilirane vode, sterilizirano u autoklavu na 121 °C tijekom 20 minuta te ohlađeno na sobnu temperaturu. Zasebno je sterilizirano 10 cm<sup>3</sup> destilirane vode u staklenim epruvetama. Nakon toga, u aseptičnim uvjetima rada, naciepljeno je 5 micelijskih diskova (izbušenih pomoću sterilnog bušača čepova promjera 6 mm) kultura *T. versicolor* i *H. grisea*, suspendiranih u

epruvetama s 10 cm<sup>3</sup> sterilizirane destilirane vode (**Slika 8** i **Slika 9**). Za svaki mikroorganizam provedena su tri paralelna pokusa. Teglice s uzorcima stavljene su na inkubaciju u inkubator (Binder, Tuttlingen, Njemačka) na 27 °C (uzgoj *T. versicolor*) i 45 °C (uzgoj *H. grisea*) s podešenom ventilacijom na 10 %. Nakon 10 dana uzgoja, proces je zaustavljen sterilizacijom.

Dodatno, provedeni su nezavisni eksperimenti analize aktivnosti lipaze tijekom procesa rasta *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* na konopljinjoj pogači, tijekom 20 dana trajanja pokusa. U tu svrhu su nakon 6., 10., 15., i 20. dana u sterilnim uvjetima uzorkovani uzorci (oko 3 g). Provedena je kruto-tekuća ekstrakcija (1 g uzorka ekstrahirano je u 5 cm<sup>3</sup> 0,1 M fosfatnom puferu pH = 7,0). Nakon centrifugiranja (na +4 °C, 15 000 g, 10 minuta) iz tekućinskog ostatka mjerena je aktivnost lipaze.



**Slika 8.** Postupak naciepljivanja kulture *H. grisea* na pogaču konoplje: a) kultura *H. grisea* na PDA agaru, b) micelijski diskovi *H. grisea* na PDA agaru, c) *H. grisea* na konopljinjoj pogači nakon 10.-og dana uzgoja.



**Slika 9.** Postupak naciepljivanja kulture *T. versicolor* na pogaču konoplje: a) kultura *T. versicolor* na PDA agaru, b) suspendirani micelijski diskovi *T. versicolor*, c) *T. versicolor* na konopljinjoj pogači nakon 10.-og dana uzgoja.

### 3.3.3. Određivanje udjela vode i mineralnih tvari

Udio vode u uzorcima prije, tijekom i nakon biološke obrade određen je gravimetrijski sušenjem pri 105 °C do konstantne mase. Udio mineralnih tvari (pepela) u uzorcima prije, tijekom i nakon obrade određen je žarenjem uzorka pri 550 °C.

Udio pepela izračunat je prema sljedećoj formuli (2):

$$\% \text{ pepela} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (2)$$

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)

### 3.3.4. Određivanje udjela masti po Soxhletu

Određivanje udjela masti u uzorcima prije i nakon obrade određeno je prema metodi po Soxhletu. Metoda se temelji na direktnoj ekstrakciji lipida iz uzoraka pomoću organskog otapala. Ekstrakcijom masti po Soxhletu određuje se slobodna mast.

U odmašćeni tuljak za ekstrakciju, odvagano je oko 5 g uzorka na analitičkoj vagi (CRYSTAL 200 CE, Gibertini, Italija) koji je potom zatvoren vatom. Tikvica po Soxhletu s nekoliko kuglica za vrenje, prethodno je osušena u sušioniku na temperaturi od 100 °C jedan sat, ohlađena u eksikatoru 30 minuta te izvagana. Nakon toga, tuljak je stavljen u ekstraktor (srednji dio aparata po Soxhletu), na njega je spojena tikvica i dodano oko 150 cm<sup>3</sup> petrol-etera. Otapalo je zatim predestilirano, ostatak isparen na vodenoj kupelji, a ekstrakt skupljen u tikvici. Ekstrakcija je trajala 4 sata te je tikvica nakon ekstrakcije osušena u sušioniku na temperaturi od 100 °C, ohlađena u eksikatoru (30 minuta) i izvagana. Sušenje je ponovljeno 30 minuta na istoj temperaturi, odnosno do konstantne mase (2 sata sušenja).

Prema sljedećoj formuli (3) izračunat je udio masti u konopljinom pogači:

$$\text{Udio masti} = \frac{a \times 100}{b} (\%) \quad (3)$$

gdje je:  $a$  – masa ekstrahirane masti (g)

$b$  – masa ispitivanog uzorka (g)

### 3.3.5. Određivanje koncentracije ukupnih proteina po Kjeldahl-u

Određivanje udjela proteina u uzorcima prije i nakon obrade određeno je metodom po Kjeldahl-u. Udio proteina u uzorku se određuje indirektno iz udjela dušika. Metoda se sastoji od 3 faze: vlažnog spaljivanja/oksidacije, destilacije i titracije.

U prvoj fazi uzorak je zagrijavan s koncentriranom sumpornom kiselinom ( $H_2SO_4$ ) uz dodatak katalizatora ( $CuSO_4$ ) i soli za povišenje vrelišta ( $Na_2SO_4$ ) prilikom čega dolazi do potpune oksidacije organske tvari. Dušik se oslobađa u obliku amonijaka ( $NH_3$ ) te sa  $H_2SO_4$  daje amonijev sulfat [ $(NH_4)_2SO_4$ ]. Razaranje je trajalo 1 sat, a postupak je proveden u bloku za spaljivanje pri temperaturi od 420 °C. U drugoj fazi (destilacija) djelovanjem natrijeve lužine (35%-tna NaOH) i  $(NH_4)_2SO_4$  dolazi do oslobodanja amonijaka koji se potom predestilira vodenom parom u tikvicu s klorovodičnom kiselinom (0,1 M HCl) u koju je dodano par kapi indikatora. Nakon skupljenih 100 cm<sup>3</sup> destilata provjeren je pH koji je iznosio 7, a indikator papir prikazivao zelenu boju. U zadnjoj fazi višak klorovodične kiseline određen je titracijom s natrijevom lužinom (0,1 M).

Udio proteina se računa prema formuli (4):

$$\% N = \frac{(a-b) \times f \times 0,14}{c} \quad (4)$$

gdje je: % N – udio dušika

$a$  – 0,1 M otopina NaOH upotrebljenog za titraciju slijepa probe (cm<sup>3</sup>)

$b$  – 0,1 M otopina NaOH upotrebljenog za titraciju glavne probe (cm<sup>3</sup>)

$f$  – faktor upotrebljenog 0,1 M NaOH

$c$  – masa uzorka (g)

$$\text{Udio bjelančevina (\%)} = \% N \times f \quad (5)$$

gdje je: % N – udio dušika

$f$  – faktor za izračunavanje udjela proteina u konopljinjnoj pogači = 5,39 (Shukla, 2009.)

### 3.3.6. Određivanje udjela neutralnih detergent vlakana prema Van Soest-u

Metoda se temelji na otapanju topljivih ugljikohidrata, većine proteina, lipida, topljivih mineralnih tvari, pektina i silicija. Topljivi sadržaj definiran je kao neutralni detergent topljivih tvari (NDF). Ostatak se sastoji od vlaknastih dijelova biljnih stanica: celuloze, hemiceluloze, lignina, kutina, netopivih mineralnih tvari te stanične stijenke nekih proteina.

U prethodno osušene (100 °C, 1 sat) i ohlađene (30 minuta u eksikatoru) te izvagane gučeve poroziteta P2 (40 μm – 60 μm), izvagano je 1 g uzorka i stavljeno u uređaj za određivanje vlakana (Velp Scientifica FIWE). Uzorci su nakon 10. dana obrade s *T. versicolor* i *H. grisea* sterilizirani, osušeni u sušioniku na temperaturi od 45 °C te samljeveni na veličinu čestica od 1 mm na ultracentrifugalnom mlinu. U gučeve je potom dodan natrijev sulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), potrebna količina neutralne detergent otopine sobne temperature i par kapi n-oktanola. Otopina je zagrijana do vrenja nakon čega je provedeno refluksiranje u trajanju od 60 minuta. Nakon toga, sadržaj gučeva je 3 puta ispran vrućom destiliranom vodom i profiltriran te 2 puta sa hladnim acetonom. Gučevi su stavljani na sušenje u sušionik (Memmert UFE 500) pri temperaturi od 105 °C tijekom 8 sati, ohlađeni 1 sat i izvagani.

Udio NDF-a izračunat je prema formuli (6):

$$NDF (\%) = \frac{(m_1 + m_3) - m_1}{m_2} \times 100 \quad (6)$$

gdje je: NDF – neutralni detergent vlakna (%)

$m_1$  – masa praznog guča (g)

$m_2$  – masa ostatka (g)

$m_3$  – masa uzorka (g)

### 3.3.7. Određivanje udjela kiselih detergent vlakana prema Van Soest-u

Metoda se temelji na otapanju topljivih ugljikohidrata, proteina, lipida, hemiceluloze i topljivih mineralnih tvari pomoću kisele otopine detergenta. Ostatak vlakana se sastoji od celuloze, lignina, kutina i mineralnih tvari netopivih u kiselini te je definiran kao ADF. Razlika između NDF i ADF predstavlja udio hemiceluloze u uzorku.

U prethodno osušene (100 °C, 1 sat) i ohlađene (30 minuta u eksikatoru) te izvagane gučeve poroziteta P2 (40 μm – 60 μm), izvagano je 1 g uzorka i stavljeno u uređaj za određivanje vlakana. Uzorci su nakon 10. dana biološke obrade s mikroorganizmima sterilizirani, osušeni u sušioniku na temperaturi od 45 °C te samljeveni na veličinu čestica od 1 mm. U gučeve je dodana potrebna količina kisele otopine detergenta sobne temperature i par kapi n-oktanola te zagrijano do vrenja. Refluksiranje je provedeno u trajanju od 60 minuta, a nakon isteka vremena profiltrirano i isprano 3 puta vrućom destiliranom vodom te 2 puta hladnim acetonom. Gučevi su potom stavljeni na sušenje pri temperaturi od 105 °C tijekom 8 sati, ohlađeni 1 sat i izvagani.

Izračun:

$$ADF (\%) = \frac{(m_1+m_3)-m_1}{m_2} \times 100 \quad (7)$$

gdje je: ADF – kiseli detergent vlakna (%)

$m_1$  – masa praznog guča (g)

$m_2$  – masa ostatka (g)

$m_3$  – masa uzorka (g)

### 3.3.8. Određivanje udjela kiselog detergenta lignina prema Van Soest-u

Metoda se temelji na otapanju celuloze sa 72 % sumpornom kiselinom pri čemu ostatak vlakana predstavlja lignin s primjesama kutina.

U prethodno osušene (100 °C, 1 sat) i ohlađene (30 minuta u eksikatoru) te izvagane gučeve poroziteta P2 (40 μm – 60 μm), izvagano je 1 g uzorka i stavljeno u uređaj za određivanje vlakana. Uzorci su nakon 10. dana obrade s mikroorganizmima sterilizirani, osušeni u sušioniku na temperaturi od 45 °C te samljeveni na veličinu čestica od 1 mm. U gučeve je dodana potrebna količina 72 %-tne sumporne kiseline te je provedena hladna ekstrakcija tijekom 3 sata s miješanjem sadržaja svakih sat vremena. Nakon toga gučevi su profiltrirani i 3 puta isprani vrućom destiliranom vodom, odnosno dokle god je bila pristuna reakcija kiseline te s



još 2 puta hladnim acetonom. Potom su gučevi stavljeni na sušenje na temperaturi od 105 °C tijekom 8 sati, ohlađeni 1 sat i izvagani.

Izračun:

$$ADL (\%) = \frac{(m_1+m_3)-m_1}{m_2} \times 100 \quad (8)$$

gdje je:  $m_1$  – masa praznog guča (g)

$m_2$  – masa ostatka (g)

$m_3$  – masa uzorka (g)

### 3.3.9. Određivanje udjela ukupnog ugljika, anorganskog ugljika i ukupnog organskog ugljika

Za određivanje ukupnog organskog ugljika (TOC), potrebno je prvo izmjeriti udjele ukupnog organskog (TC) i ukupnog anorganskog ugljika (IC).

Za mjerenje udjela ukupnog ugljika TC-a (*total carbon*), keramičke lađice prethodno su spaljene u mufolnoj peći 1 sat na 550 °C, ohlađene u eksikatoru (1 sat) te izvagane. Potom je u njih odvagano 30 mg osušenog i usitnjenog uzorka koji je prije analize prekriven tankim slojem keramičke vune. Svaki uzorak analiziran je u 3 paralelne serije. Na računalu je odabrana kalibracijska krivulja pomoću koje je određena vrijednost TC-a. Lađice su stavljene u jedinicu za čvrste uzorke (SSM-5000A Shimadzu) na TOC analizatoru za određivanje ukupnog organskog ugljika. Nakon 3 minute lađica je pomaknuta u „measuring“ položaj gdje je temperatura 900 °C te je nakon mjerenja očitana vrijednost ukupnog ugljika u uzorku.

Kod određivanja IC-a (*inorganic carbon*), keramičke lađice prethodno su spaljene u mufolnoj peći 1 sat na 550°C, ohlađene u eksikatoru (1 h) i izvagane. Potom je u njih odvagano 30 mg osušenog i usitnjenog uzorka koji je prije analize prekriven tankim slojem keramičke vune. Svaki uzorak analiziran je u 3 paralelne serije. Na računalu je odabrana kalibracijska krivulja pomoću koje je određena vrijednost IC-a. Lađice su stavljene u jedinicu za čvrste uzorke (SSM-5000A Shimadzu) na TOC analizatoru za određivanje ukupnog organskog ugljika. Nakon 3 minute u lađicu je dodano 500 µL 25%-tne fosforne kiseline te je zatim pomaknuta u

„measuring“ položaj. Analiza anorganskog ugljika provodi se na 250 °C, a nakon mjerenja očitana je vrijednost anorganskog ugljika u uzorku.

Metoda određivanja ukupnog organskog ugljika temelji se na oksidaciji organskih tvari do ugljikovog dioksida i vode, a primjenjuje se kao kvantitativni pokazatelj prisutnosti organske tvari. Udio ukupnog organskog ugljika izračunat je prema formuli (9):

$$TOC (\%) = TC - IC \quad (9)$$

### 3.3.10. Određivanje koncentracije šećera u ekstraktima iz konopljine pogače HPLC metodom

Prije određivanja koncentracije šećera u ekstraktima, određen je udio suhe tvari u svježoj steriliziranoj i biološki obrađenoj pogači konoplje. Nakon toga je provedena kruto-tekuća ekstrakcija. U staklene tikvice odvagano je 1 g osušenog i usitnjenog uzorka biološki obrađene pogače konoplje te je dodano 20 cm<sup>3</sup> destilirane vode. Tikvice su potom stavljene u vodenu kupelj s tresilicom (Julabo SW23, Njemačka) gdje su podešeni optimalni uvjeti za ekstrakciju šećera ( $T = 30$  °C;  $t = 30$  minuta;  $n = 170$  rpm). Nakon provedene ekstrakcije, suspenzija uzorka i otopine dekantirana je u epruvete te centrifugirana tijekom 10 minuta pri 10 000 g na temperaturi od 30 °C, a dobiveni supernatant profiltriran i korišten za određivanje koncentracije šećera tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti.

Nakon provedene kruto-tekuće ekstrakcije, određena je koncentracija šećera u tekućinskim ostatcima tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (Nexera XR UHPLC, Shimadzu). Kao mobilna faza korištena je otopina acetonitrila i ultračiste vode u omjeru 75 : 25 s protokom mobilne faze 1 cm<sup>3</sup>/min. Za uklanjanje plinova u mobilnoj fazi korištena je ultrazvučna kupelj (Elmasonic P120 H, Elma), a otplinjavanje je trajalo 5 minuta.

Prije HPLC analize uzorci su profiltrirani na membranskom filteru s veličinom pora 0,22 μm u bočice za HPLC (viale), kako bi se uklonile nečistoće, a uzorci bili spremni za određivanje koncentracije pojedinih šećera.

Kao analitička kolona korištena je Inert Sustain NH<sub>2</sub>, a volumen injektiranog uzorka iznosio je 10 μL, dok je vrijeme eluiranja trajalo 20 minuta. Tlak pumpe je bio podešen na 40 bara, a temperatura kolonske pećnice bila je 40 °C.

Nakon dobivenih kromatograma, provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza šećera u 2 ponavljanja. Identifikacija pojedinačnih komponenti šećera (kvalitativna analiza) provedena je usporedbom retencijskih vremena u uzorku s retencijskim vremenima nakon injektiranja poznatog standarda šećera određene koncentracije u uzorku. Maseni udio šećera (kvantitativna analiza) u uzorcima određen je obradom podataka pomoću odgovarajućeg softvera (*LabSolution*), integriranjem površine ispod pikova na temelju prethodno izrađenih kalibracijskih krivulja (linearnom regresijskom analizom pomoću regresijskog modela najmanjih kvadrata).

Izračunate su koncentracije pojedinih šećera u ekstraktu svježe i biološki obrađene konopljinje pogače te su preračunate na suhu tvar uzoraka prema sljedećem izrazu (10):

$$C = \frac{c \cdot V_e}{m_{uz} \cdot w_{s.t.}} \cdot 100 \quad (10)$$

gdje je:  $C$  – maseni udio analizirane tvari u ekstraktu (mg/g<sub>s.t.</sub>)

$c$  – masena koncentracija analizirane tvari u ekstraktu (mg/cm<sup>3</sup>)

$V_e$  – ukupni volumen dobivenog ekstrakta (cm<sup>3</sup>)

$m_{uz}$  – masa uzorka (g)

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

### 3.3.11. Mjerenje volumne aktivnosti enzima lipaza

#### *Priprema sirovog enzimskog pripravka*

Za pripremu sirovog enzimskog pripravka, provedena je ekstrakcija s 0,1 M fosfatnim puferom (pH =7) koji je pripremljen na sljedeći način:

Prvotno su pripremljene 2 otopine (A i B) od 1 dm<sup>3</sup> koncentracije 1 mol/dm<sup>3</sup>, tako što je za otopinu A odvagano 136,09 g soli KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, a za otopinu B odvagano je 174,18 g soli K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Svaka kemikalija pojedinačno je otopljena u destiliranoj vodi te prenesena u odmjernu tikvicu i nadopunjena do oznake s destiliranom vodom. Za jednu litru 1 M fosfatnog pufera (PB) pomiješano je 160 cm<sup>3</sup> A otopine i 840 cm<sup>3</sup> B otopine čiji je pH iznosio 7,27. Iz ovog pufera zatim je pripremljen 0,1 M PB tako što je u čašu dodano 100 cm<sup>3</sup> 1 M PB i oko 800 cm<sup>3</sup>

destilirane vode. pH je iznosio 7,6 te je pomoću fosfatne kiseline podešen na željenu vrijednost pH = 7. Pripremljene otopine čuvane su u hladnjaku na +4 °C za daljnje analize.

Ekstrakcija je provedena na način da je u plastične epruvete dodano 1 g uzorka i 5 cm<sup>3</sup> hladnog fosfatnog pufera (0,1 M, pH = 7). Svakih 5 minuta, tijekom 30 minuta, suspenzija je promiješana na vortex mješalici (TEHTNICA Vibromix 10), a uzorci su tijekom ekstrakcije čuvani u hladnjaku na +4 °C. Nakon toga, ekstrakti su izbistreni u centrifugi s hlađenjem (HERMLE Z 326 K, Njemačka) pri 15 000 g tijekom 10 minuta, na temperaturi +4 °C. Uzorci su potom profiltrirani preko nabranog filter papira u plastične falcon epruvete te je očitani volumen dobivenog supernatanta. Filtrati su čuvani u hladnjaku do provedbe potrebnih analiza.

#### *Mjerenje volumne aktivnosti lipaze*

Enzimsku aktivnost proizvedenog sirovog enzimskog pripravka određena je testom fiksnog vremena (*end-point* test), a kao supstrat korišten je *p*-nitrofenil palmitat (Palacios i sur., 2014.). Apsorbancija supernatanta, dobivenog nakon ekstrakcije, mjerena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 410 nm. Molarni apsorpcijski koeficijent određen je mjerenjem apsorbancije otopine *p*-nitrofenola pripremljenog na isti način kao reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti enzima, ali bez dodane lipaze. Aktivnost lipaze izražena je u internacionalnim jedinicama za mjerenje aktivnosti enzima (U) pri čemu je jedna jedinica definirana kao ona količina lipaze koja razgradi 1 μmol *p*-nitrofenil palmitata za 1 minutu. Postupak mjerenja je proveden u 3 paralele.

Za provođenje testa aktivnosti pripremljene su sljedeće otopine:

**Otopina 100 mM Tris-HCl pufera (pH=8)** – pomiješano je 10 cm<sup>3</sup> 1M Tris-baze i oko 80 cm<sup>3</sup> destilirane vode, a pH vrijednost podešena na pH 8 sa klorovodičnom kiselinom. Sadržaj je prebačen u odmjernu tikvicu i nadopunjeno destiliranom vodom te stavljeno u hladnjak (+4 °C).

**Marmur otopina** - pomiješani su kloroform i izoamilni alkohol u volumnom omjeru 24:1 te čuvano na sobnoj temperaturi (Palacios i sur., 2014.).

**Otopina supstrata (1 mM)** – pripremljeno je 40 cm<sup>3</sup> otopine na način da je u čašu s mješačem dodano 20 cm<sup>3</sup> 100 mM Tris-HCl pufera (pH = 8) u kojoj je otopljeno 0,1 % w/v arapske gume (0,036 g). U pripremljeni pufer s emulgatorom postepeno je dodano 4 cm<sup>3</sup> 10 mM otopine

pNPP (0,0151 g) u 2-propanolu (kap po kap), a ostatak nadopunjen destiliranom vodom čiji je volumen iznosio 16 cm<sup>3</sup> (Palacios i sur., 2014.).

Test aktivnosti je proveden na sljedeći način:

Pripremljeno je 240 cm<sup>3</sup> otopine supstrata za koju je dodano 120 cm<sup>3</sup> 100 mM Tris-HCl-a u kojem je otopljeno 0,216 g arapske gume (0,1 % w/v). U pufer je potom dodano 10 mM pNPP (izvagano 0,0906 g) koji je otopljen u 24 cm<sup>3</sup> 2-propanola, a na kraju je dodano 96 cm<sup>3</sup> destilirane vode. Ova otopina pripremljena je neposredno prije provođenja testa te je korištena za pripremu glavnih proba i kontrola raspada supstrata. Kontrola raspada supstrata predstavlja slijepu probu, odnosno reakcijsku smjesu bez dodatka ekstrakta, dok kontrolu ekstrakta čini reakcijska smjesa sa dodanim ekstraktom bez prisutnosti supstrata. Za kontrolu ekstrakta pripravljeno je 100 cm<sup>3</sup> otopine na način da je u 50 cm<sup>3</sup> 100 mM Tris-HCl-a otopljeno 0,09 g arapske gume (0,1 % w/v), dodano 10 cm<sup>3</sup> 2-propanola te 40 cm<sup>3</sup> destilirane vode.

Za svaki ekstrakt pripremljene su 3 glavne probe, kontrola supstrata i kontrola ekstrakta. U plastične epruvete dodano je po 3,9 cm<sup>3</sup> pripadajuće otopine. U prethodno zagrijanu vodenu kupelj (Memmert WNB 14) na 40 °C, epruvete su stavljene na termostatiranje (5 minuta). Nakon isteka vremena u epruvete je dodano po 100 µL ekstrakta (u glavne probe i kontrolu ekstrakta), dok je u kontrolu supstrata dodano 100 µL destilirane vode. Nakon dodanog ekstrakta, reakcijske smjese u epruvetama su kratko homogenizirane na vortexu i stavljene u vodenu kupelj 30 minuta. Nakon termostatiranja na 40 °C, u epruvete je dodano po 1,5 cm<sup>3</sup> Marmur otopine, kratko vorteksirano i potom centrifugirano na 15 000 g u trajanju od 5 minuta. Nakon centrifugiranja, u PMMA kivete volumena 1 cm<sup>3</sup> otpipetiran je gornji sloj supernatanta te je izmjerena apsorbancija fenola pri 410 nm na spektrofotometru.

Volumna aktivnost enzima izračunata je prema sljedećoj jednadžbi (12):

$$V.A. (U/cm^3) = \frac{(A_{GP,410\text{ nm}} - A_{KRS,410\text{ nm}} - A_{KE,410\text{ nm}}) \cdot Df \cdot V_{uk}}{t \cdot V_{uzorak} \cdot d \cdot \varepsilon} \quad (12)$$

gdje je: V.A. – volumna aktivnost (U/cm<sup>3</sup>)

$A_{GP, 410\text{ nm}}$  – apsorbancija glavne probe izmjerene na valnoj duljini pri 410 nm

$A_{KRS, 410\text{ nm}}$  – apsorbancija kontrole raspada supstrata izmjerene na valnoj duljini pri 410 nm

$A_{KE, 410 \text{ nm}}$  – apsorbancija kontrole ekstrakta izmjerene na valnoj duljini pri 410 nm

$D_f$  – faktor razrjeđenja

$V_{uk}$  – ukupni volumen reakcijske smjese ( $\text{cm}^3$ )

$t$  – vrijeme trajanja testa (min)

$V_{uzorak}$  – volumen uzorka dodanog u test ( $\text{cm}^3$ )

$d$  – promjer kivete (cm)

$\epsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent *p*-nitrofenola ( $\text{cm}^3/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$ ) - 0,29866

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Analiza kemijskog sastava konopljinje pogače prije i nakon biološke obrade s *Trametes versicolor*

Udio vode, pepela, ukupnih proteina, ukupnog organskog ugljika, masti te vlakana (NDF, ADF, ADL) u konopljinoj pogači prije i poslije biološke obrade s gljivom bijelog truljenja *Trametes versicolor* prikazani su u **Tablici 4.**

**Tablica 4.** Kemijski sastav konopljinje pogače prije i poslije biološke obrade s *Trametes versicolor*

PARAMETAR	JEDINICA	PRIJE BIOLOŠKE OBRADJE	POSLIJE BIOLOŠKE OBRADJE
VLAŽNOST	%	60	55,49
PEPEO	% s.t.	7,48 ± 0,00	7,97 ± 0,12
UKUPNI PROTEINI	% s.t.	24,77 ± 0,57	28,63 ± 0,24
UKUPNI ORGANSKI UGLJIK (TOC)	% s.t.	66,74 ± 0,04	67,99 ± 4,14
UDIO MASTI	% s.t.	12,34 ± 0,00	2,44 ± 1,06
NEUTRALNA DETERGENT VLAKNA (NDF)	% s.t.	53,43 ± 1,21	63,30 ± 0,52
KISELA DETERGENT VLAKNA (ADF)	% s.t.	39,19 ± 0,19	47,03 ± 0,62
KISELI DETERGENT LIGNIN (ADL)	% s.t.	16,69 ± 0,35	19,05 ± 0,13

Udio suhe tvari u konopljinoj pogači je prije biološke obrade iznosio 92,92%, a nakon 10. dana udio suhe tvari se smanjio na 44,51%. Udio mineralnih tvari (pepela) je porastao sa 7,48% s.tv. na 7,97% s.tv. Iz analize udjela proteina, u **Tablici 4.** vidljivo je da konopljina pogača ima niži udio proteina (24,77 ± 0,57% s.tv.) u usporedbi s podacima iz literature (24,86 – 56,3% s.tv.) što je prikazano u **Tablici 3.** Nakon 10. dana obrade s *T. versicolor* udio proteina je porastao na 28,63% s.tv, a porast udjela proteina prati i porast vlakana. Udio masti u konopljinoj pogači je nešto viši (12,34% s.tv.) od vrijednosti pronađenih u literaturi gdje se udio masti kreće od 5,18% do 11,9% s.tv. Ovakvi podaci mogu se objasniti na način što se u procesu proizvodnje ulja koriste različite tehnologije prešanja. U ovom diplomskog radu korištene su pogače nastale nakon procesa proizvodnje hladnog prešanja ulja gdje temperatura prešanja ne prelazi 50 °C. Kod toplog prešanja, primjenjuju se temperature u rasponu od 80 do 100 °C. Za razliku od porasti udjela proteina, udio masti je nakon obrade značajno smanjen, s početne vrijednosti 12,34 % s.tv. na vrijednost od 2,44% s.tv.

Udio NDF-a za ovaj tip pogača, prema literaturnim podacima iznosi od 19,0 do 41,5% s.tv., a udio ADF-a od 12,4 do 32,0% s.tv. U ovom radu udio NDF-a je u svježoj pogači konoplje bio 53,43% s.tv., a ADF-a 39,19% s.tv. Udio ADL-a je u svježoj pogači iznosio 16,69 % s.tv. Nakon



biološke obrade s *T. versicolor* udio svih vlakana je porastao. Udio NDF-a je porastao za 9,87%, ADF-a za 7,84% i ADL-a za 2,36%. Nadalje, udio ukupnog organskog ugljika (TOC) se povećao nakon biološke obrade s *T. versicolor* s 66,74 % s.tv. na 67,99% s.tv.

#### 4.2. Analiza kemijskog sastava konopljine pogače prije i nakon biološke obrade s *Humicola grisea*

Udio vode, pepela, ukupnih proteina, ukupnog organskog ugljika, masti te vlakana (NDF, ADF, ADL) u konopljinoj pogači prije i poslije biološke obrade s *Humicola grisea* prikazani su u **Tablici 5**.

**Tablica 5.** Kemijski sastav konopljine pogače prije i poslije biološke obrade s *Humicola grisea*

PARAMETAR	JEDINICA	PRIJE BIOLOŠKE OBRADJE	POSILIJE BIOLOŠKE OBRADJE
VLAŽNOST	%	60	7,80
PEPEO	% s.t.	7,48 ± 0,00	8,19 ± 0,27
UKUPNI PROTEINI	% s.t.	24,77 ± 0,57	27,95 ± 0,23
UKUPNI ORGANSKI UGLJIK (TOC)	% s.t.	66,74 ± 0,04	67,70 ± 0,36
UDIO MASTI	% s.t.	12,34 ± 0,00	11,80 ± 0,10
NEUTRALNA DETERGENT VLAKNA (NDF)	% s.t.	53,43 ± 1,21	61,05 ± 0,31
KISELA DETERGENT VLAKNA (ADF)	% s.t.	39,19 ± 0,19	43,13 ± 0,72
KISELI DETERGENT LIGNIN (ADL)	% s.t.	16,69 ± 0,35	17,10 ± 0,44

Udio suhe tvari u konopljinoj pogači je prije biološke obrade iznosio 92,92%, a poslije 10. dana se neznatno smanjio na 92,20%. Udio mineralnih tvari (pepela) je porastao sa 7,48% s.tv. na 8,19% s.tv. Vrijednost udjela ukupnih proteina u konopljinoj pogači nakon 10. dana obrade s *H. grisea* je porasla na 27,95% s.tv. Porast udjela proteina prati porast vlakana.

U svježoj pogači je udio masti iznosio 12,34% s.tv., a u obrađenoj 11,80% s.tv, što je značajno više nego u uzorcima koji su obrađeni sa *T. versicolor*. Udio vlakana (NDF, ADF, ADL) se u konopljinoj pogači nakon obrade s *H. grisea* povećao, pri čemu je udio NDF-a porastao za 7,62%, ADF-a za 3,94%, a udio ADL-a za 0,41%.

Rezultati kemijskog sastava nakon obrade konopljine pogače s *T. versicolor* i *H. grisea* su ujednačeni. Najveća razlika je ona u vrijednostima udjela masti te bi se moglo zaključiti da *T.*

*versicolor* koristi mast kao izvor ugljika kao i pretpostaviti da je smanjenje udjela masti posljedica sinteze lipaze.

### 4.3. Rezultati aktivnosti lipaze tijekom uzgoja *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* na konopljinoj pogači

Rezultati mjerenja aktivnosti lipaze u ekstraktima pripremljenim nakon 3., 6., 7., 10., 15. i 20. dana obrade s *T. versicolor* i *H. grisea*, prikazani su u **Tablici 6**. Prema dobivenih podacima može se zaključiti da oba mikroorganizma nisu proizveli značajnu količinu lipaze. Najveća aktivnost u ekstraktu konopljine pogače izmjerena je 7. dan nakon obrade s *T. versicolor* (V.A. = 4.35 U/cm<sup>3</sup>). Prema podacima iz literature, obradom različitih pogača s različitim mikroorganizmima, postignute su značajno veće aktivnosti, izražene u specifičnim aktivnostima (od 24,24 U/g do 1084 U/g).

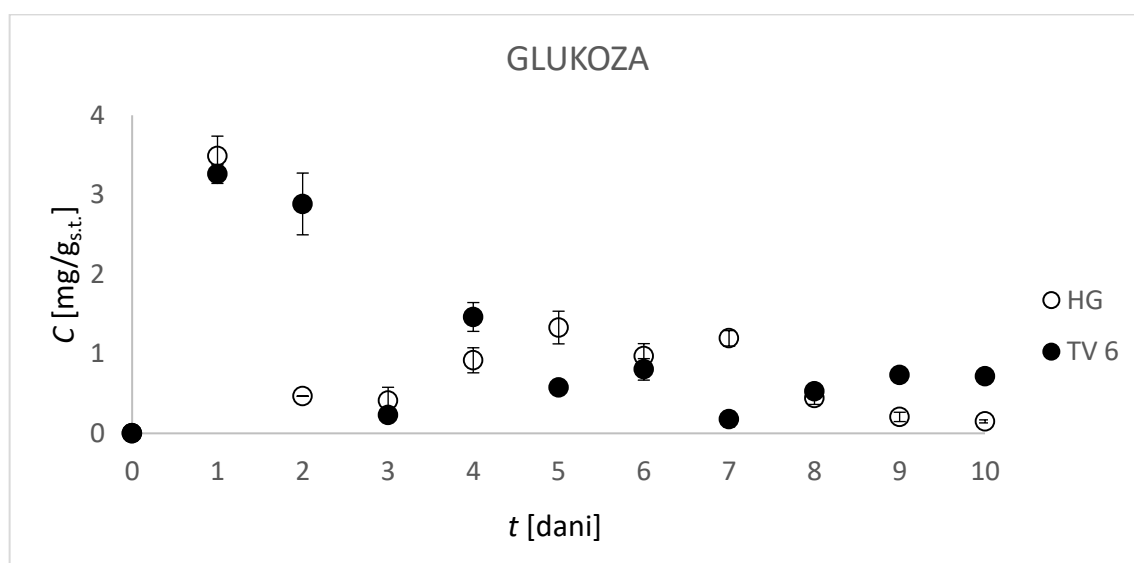
**Tablica 6.** Aktivnost lipaze u ekstraktima tijekom biološke obrade konopljine pogače s *T. versicolor* i *H. grisea*

DANI INKUBACIJE	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Humicola grisea</i>
	AKTIVNOST LIPAZE [U/cm <sup>3</sup> ]	
3.	0	1,67
6.	0	1,36
7.	4,35	0,50
10.	1,92	1,34
15.	1,24	1,73
20.	0,60	0,38

#### 4.4. Rezultati masenih udjela šećera u ekstraktima konopljine pogače tijekom biološke obrade s *Trametes versicolor* i *Humicola grisea*

Eksperimentalno dobiveni podaci identificiranih i kvantificiranih šećera (glukoza, fruktoza, saharoza, maltoza i maltotrioza) u vodenim ekstraktima biološki obrađenih uzoraka konoplje pogače s *T. versicolor* i *H. grisea* prikazani su grafički (Slike 10. – 14.).

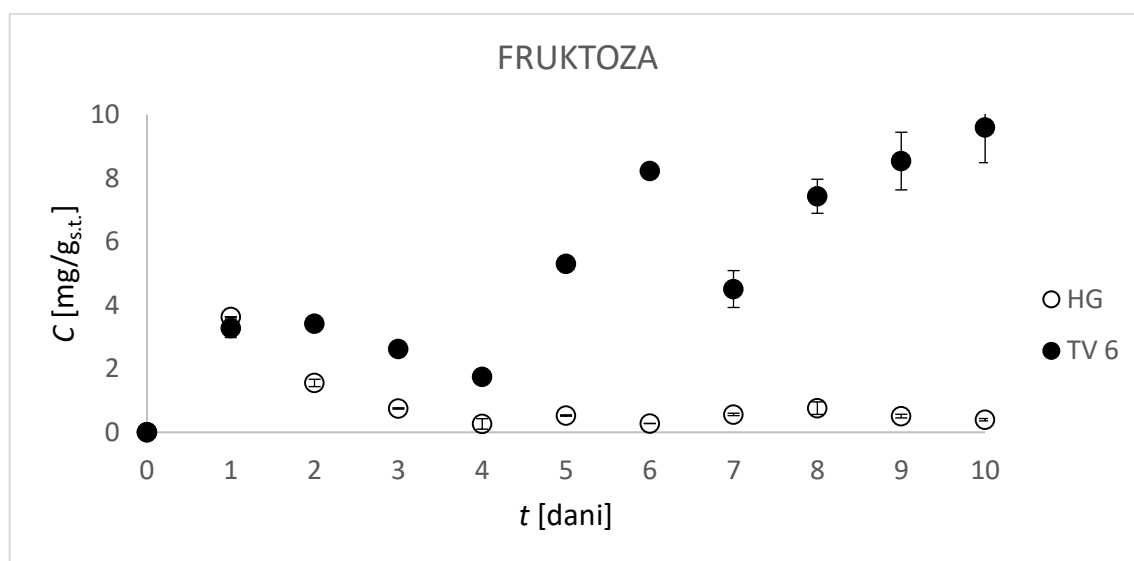
Na Slici 10. je prikazana ovisnost koncentracije glukoze o vremenu fermentacije tijekom biološke obrade pogače konoplje s dva istraživana mikroorganizma.



**Slika 10.** Srednje vrijednosti masenog udjela glukoze u ekstraktima biološki obrađene konopljine pogače s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije

Iz dobivenih rezultata, vidljivo je da u vodenim ekstraktima pogače, prije naciepljivanja radnog mikroorganizma (0. dan) nije bila detektirana glukoza. Nakon prvog dana, glukoza je identificirana i kvantificirana u oba provedena pokusa, pri čemu je u pokusu s *H. grisea* koncentracija glukoze iznosila 3,49 mg/g<sub>s.t.</sub>, a u pokusu s *T. versicolor* iznosila je 3,26 mg/g<sub>s.t.</sub>. Već nakon 2. dana trajanja bioprocasa, koncentracija glukoze je niža u odnosu nakon 1. dan i to u oba provedena pokusa, premda je iz rezultata vidljivo da je koncentracija glukoze niža u pokusu s *H. grisea* (0,47 mg/g<sub>s.t.</sub>), u odnosu na onaj s *T. versicolor* (2,89 mg/g<sub>s.t.</sub>). U daljnjim danima provedbe pokusa, glukoza je prisutna u ekstraktima u koncentracijama od 0,15 do 1,46 mg/g<sub>s.t.</sub>, što je posljedica hidrolize saharoze i/ili celuloze i hemiceluloze.

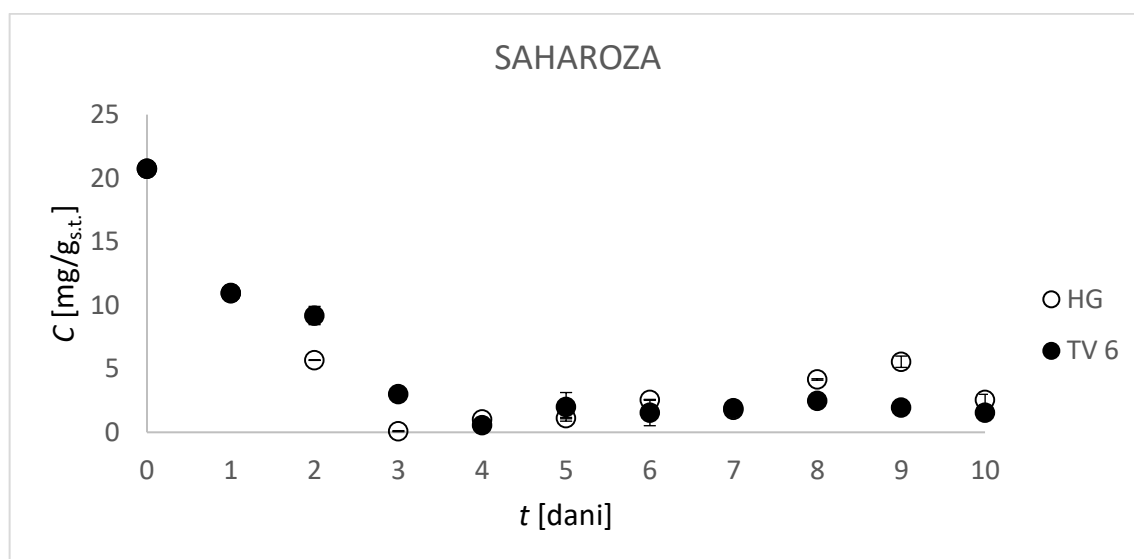
Na **Slici 11.** je prikazana ovisnost koncentracije fruktoze o vremenu fermentacije tijekom biološke obrade pogače konoplje s dva istraživana mikroorganizma.



**Slika 11.** Srednje vrijednosti masenog udjela fruktoze u ekstraktima biološki obrađene konopljinje pogače s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije

Analizom je utvrđeno da vodeni ekstrakti pogače konoplje prije naciepljivanja mikroorganizama ne sadrže fruktozu. Nakon procesa obrade, zapažen je sličan trend kao i sa glukozom, te je nakon 1. dana fermentacije, u vodenim otopinama detektirana fruktoza. Maseni udio fruktoze nakon 1. dana bio je približno sličan u oba provedena pokusa (3,28 – 3,64 mg/g<sub>s.t.</sub>), no za razliku od glukoze, iz rezultata prikazanih na **Slici 11.** se može zaključiti da *T. versicolor* ne koristi fruktozu za svoj rast i razmnožavanje. Koncentracija fruktoze nakon 10. dana u pokusu provedenom s *T. versicolor* iznosi 9,60 mg/g<sub>s.t.</sub>. Od 5. do 10. dana fermentacije, koncentracije fruktoze su bile u rasponu od 4,51 – 9,60 mg/g<sub>s.t.</sub>. S druge strane, iz rezultata je vidljivo da *H. grisea* metabolizira fruktozu, pri čemu su maseni udjeli fruktoze u vodenim ekstraktima tijekom trajanja fermentacije iznosili od 0,26 do 0,76 mg/g<sub>s.t.</sub>.

Na **Slici 12.** je prikazana ovisnost koncentracije saharoze o vremenu fermentacije tijekom biološke obrade pogače konoplje s dva istraživana mikroorganizma.

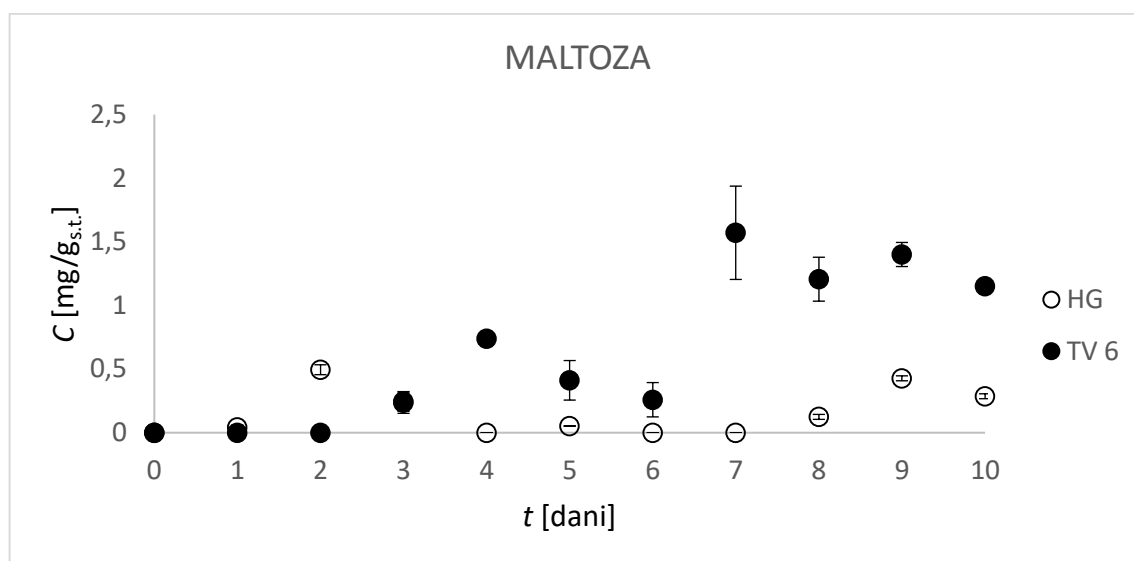


**Slika 12.** Srednje vrijednosti masenog udjela saharoze u ekstraktima biološki obrađene konopljinje pogače s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije

Maseni udio saharoze u vodenim ekstraktima pogače prije fermentacije iznosi 20,75 mg/g<sub>s.t.</sub>. Iz dobivenih rezultata prikazanih na **Slici 12.**, može se zaključiti da oba mikroorganizma hidroliziraju saharozu. U pokusu provedenom s *H. grisea*, već nakon 3. dana fermentacije vodeni ekstrakti nisu sadržavali saharozu, dok je u daljnjim danima koncentracija saharoze je bila prisutna u oba pokusa, što se može pripisati razgradnji složenijih ugljikohidrata.

Nakon 10. dana biološke obrade konopljinje pogače, vrijednost masenog udjela saharoze se smanjila te je za *T. versicolor* iznosila 1,56 mg/g<sub>s.t.</sub>, a za *H. grisea* 2,57 mg/g<sub>s.t.</sub>.

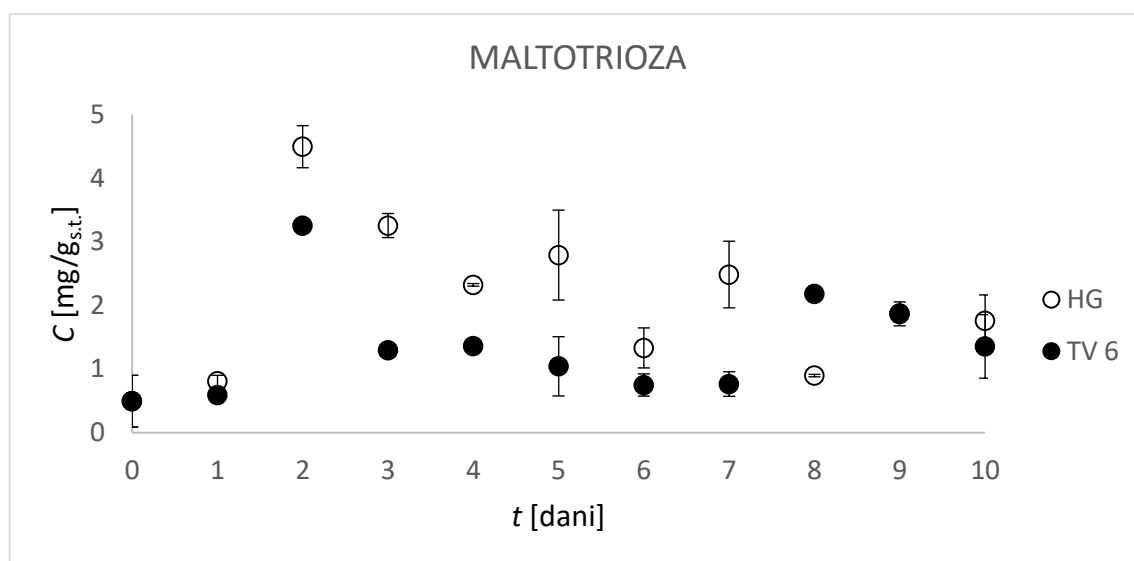
Na **Slici 13.** je prikazana ovisnost koncentracije maltoze o vremenu fermentacije tijekom biološke obrade pogače konoplje s dva istraživana mikroorganizma.



**Slika 13.** Srednje vrijednosti masenog udjela maltoze u ekstraktima biološki obrađene konopljinje pogače s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije

Vidljivo je da maltoza nije prisutna u pogači konoplje prije obrade. Porast koncentracije ovog šećera uočen je nakon 2. dana trajanja pokusa s *H. grisea* (0,50 mg/g<sub>s.t.</sub>), odnosno nakon 3. dana s *T. versicolor* (0,25 mg/g<sub>s.t.</sub>). Vidljive su značajne razlike između mogućnosti metaboliziranja ovog šećera od strane istraživana oba mikroorganizma. Od 4. do 7. dana fermentacije u pokusu s *H. grisea* maltoza nije prisutna, dok nakon 8. dana uočen je porast masenog udjela maltoze, pri čemu 10. dan ona iznosi 0,29 mg/g<sub>s.t.</sub>. U pokusu s *T. versicolor*, vrijednosti maltoze su tijekom procesa više, te 10. dan maseni udio maltoze iznosi 1,15 mg/g<sub>s.t.</sub>

Na **Slici 14.** je prikazana ovisnost koncentracije maltotrioze o vremenu fermentacije tijekom biološke obrade pogače konoplje s dva istraživana mikroorganizma.



**Slika 14.** Srednje vrijednosti masenog udjela maltotrioze u ekstraktima biološki obrađene konopljinje pogače s *Trametes versicolor* (TV6) i *Humicola grisea* (HG) u ovisnosti o vremenu fermentacije

Maseni udio maltotrioze u steriliziranoj pogači konoplje prije procesa obrade iznosio je 0,50 mg/g<sub>s.t.</sub>. Nakon 10. dana biološke obrade s *T. versicolor* koncentracija maltotrioze iznosila je 1,36 mg/g<sub>s.t.</sub>, dok je nakon obrade s *H. grisea* ona iznosila 1,76 mg/g<sub>s.t.</sub>. Najveća koncentracija maltotrioze za *T. versicolor* izmjerena je 2. dan te je iznosila 3,26 mg/g<sub>s.t.</sub>, a za *H. grisea* 2. dan i iznosila je 4,50 mg/g<sub>s.t.</sub>

## **5. ZAKLJUČCI**



Na osnovu rezultata dobivenih ovim istraživanjem, izvedeni su sljedeći zaključci:

- ✓ Konopljina pogača vrijedan je nusproizvod iz prehrambene industrije koji se može koristiti kao supstrat za proizvodnju visokovrijednih proizvoda.
- ✓ Razvijen je proces uzgoja *Trametes versicolor* i *Humicola grisea* na pogači konoplje u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.
- ✓ Biološka obrada konopljine pogače s *T. versicolor* i *H. grisea* povećava njezinu nutritivnu vrijednost (prvenstveno zbog povećanja udjela proteina) te se može koristiti u proizvodnji proteinski obogaćene hrane i gnojiva.
- ✓ Rezultati pokazuju da postoje razlike u sastavu pogače konoplje nakon biološke obrade s *T. versicolor* u odnosu na one obrađene s *H. grisea*, s obzirom na udio pepela, ukupnih proteina, ukupnog organskog ugljika, masti i vlakana.
- ✓ Smanjenje udjela masti u konopljinoj pogači, nakon biološke obrade s oba mikroorganizma, može se pripisati rezultatima aktivnosti lipaze te upotrebi masti kao izvoru hranjivih tvari za rast i razmnožavanje gljiva.
- ✓ Aktivnost lipaze određena je u ekstraktima konopljine pogače dobivenim nakon 3., 6., 7., 10., 15. i 20. dana. Postignute volumne aktivnosti u granicama od 0,38 do 4,35 U/cm<sup>3</sup> pokazuju da *T. versicolor* i *H. grisea* ne proizvode značajne količine lipaze.
- ✓ Najveća aktivnost lipaze (4,35 U/cm<sup>3</sup>) izmjerena je 7. dan nakon obrade s *T. versicolor*.
- ✓ Rezultati analize šećera ukazuju da oba mikroorganizma hidroliziraju saharozu do glukoze i fruktoze, te troše glukozu za rast, dok je pokazano da, za razliku od *H. grisea*, *T. versicolor* ne koristi izvor fruktoze za svoj rast i razmnožavanje.

## **6. LITERATURA**

- Callaway JC: Hempseed as a nutritional resource: An overview, *Euphytica* 140:65-72, 2004.
- Christopher LP, Kumar H, Zambare VP: Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy* 119:497-520, 2014.
- Cozea A, Bordei N, Popescu M, Neagu M, Gruia R: Comparative study concerning the composition of certain oil cakes with phytotherapeutical potential. *Revista de Chime* 67:422-425, 2016.
- Duraković S, Duraković L: *Mikologija u biotehnologiji*. Kugler, Zagreb, 2003.
- Gold MH, Alic M: Molecular biology of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews* 57:605-622, 1993.
- House JD, Neufels J, Leson G: Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry Article* 58:11801-11807, 2010.
- Iqbal HMN, Kyazze G, Keshavarz T: Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: An overview. *BioResources* 8:3157-3176, 2013.
- Koyani RD, Rajput KS: Solid state fermentation: Comprehensive tool for utilization of lignocellulosic through biotechnology. *Bioprocess Biotechnology* 5:10, 2015.
- Krnić M: Otpad iz industrije ulja kao supstrat za proizvodnju lipaze u sintezi biodizela. *Diplomski rad*, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2017.
- Kumar A, Kanwar SS: Lipase production in Solid-state fermentation (SSF): Recent developments and biotechnological applications. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* 6:13-27, 2012.
- Kumar A, Gautam A, Dutt D: Biotechnological transformation of lignocellulosic biomass in to industrial products: An overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 7:149-168, 2016.
- Malešević VK: Fenolni potencijal uljanih pogača. *Doktorska disertacija*. Tehnološki fakultet Novi Sad, 2016.
- 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, Krieger N, Berović M: *Solid State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*, Springer-Verlag, Berlin, 2006.
- Mussatto SI, Teixeira JA: Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 2:897-907, 2010.
- Nađ H: Istraživanje primjene gljiva bijelog truljenja za razgradnju lignina i celuloze u piljevinama hrasta kitnjaka, bukve i cera. *Diplomski rad*, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

- Ognjanović ND, Petrović SD; Bezbradica DI, Knežević-Jugović ZD: Lipaze kao biokatalizatori u sintezi biodizela. *Hemijska industrija* 64:1-8, 2009.
- Palacios D, Busto M, Ortega N: Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aqueous media. *LWT-Food Science and Technology* 55:536-542, 2014.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P: Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* 77, 1999.
- Pandey A, Soccol CR, Mitchell D: New developments in solid state fermentation: L-bioprocesses and products, *Process Biochemistry* 35:1153-1169, 2000.
- Pojić M, Mišan A, Sakač M, Hadnađev TD, Šarić B, Milovanović I, Hadnađev M: Characterization of byproducts originating from hemp oil processing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry article* 62:12436-12442, 2014.
- Primorac LJ, Flanjak I: *Kontrola kakvoća hrane*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2012.
- 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.
- Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y: *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology*, 2013.
- Shahzadi T, Mehmood S, Irshad M, Anwar Z, Afroz A, Zeeshan N, Rashid U, Sughra K: Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. *Advances in Bioscience and Biotechnology*:246-251, 2014.
- Shukla AN: *Industrial enzymology*. Discovery Publishing House Pvt. Ltd, New Delhi, 2009.
- Vujasinović V, Dimić E, Arnaut M: Seme i ulje konoplje-hrana i lek. *Uljarstvo* 43:1-2, 2012.
- Webster J, Weber RWS: *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, 2007.
- Xavier AMRB, Tavares APM, Ferreira R, Amado F: *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology* 10:444-451, 2007.