

# Utjecaj biološke obrade pljevice ječma pomoću *Trametes versicolor* na ekstrakciju fenolnih kiselina

---

Lukačić, Teo

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:369736>

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

*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**

**Teo Lukačić**

**UTJECAJ BIOLOŠKE OBRADJE PLJEVICE JEČMA POMOĆU *Trametes  
versicolor* NA EKSTRAKCIJU FENOLNIH KISELINA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Osijek, rujan 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Zavod za procesno inženjerstvo, Katedra za tehnološke operacije

Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Jedinične operacije u procesnom inženjerstvu

**Tema rada** je prihvaćena na VIII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj dana 30. 5. 2019.

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

**Pomoć pri izradi:** Gordana Šelo, mag. ing.

### Utjecaj biološke obrade pljevice ječma pomoću *Trametes versicolor* na ekstrakciju fenolnih kiselina

Teo Lukačić

#### Sažetak:

Cilj rada bio je odrediti utjecaj biološke obrade pljevice ječma na ekstraktibilnost fenolnih kiselina u odnosu na biološki neobrađene uzorke. Biološka obrada provedena je pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima tijekom 10 dana u dodatak i bez dodatka ljuske jajeta kao induktora sinteze enzima. *Trametes versicolor* je gljiva iz skupine basidiomycota koja proizvodi smjesu lignolitičkih enzima koji imaju sposobnost razgradnje lignina i aromatskih spojeva u spojeve niže molekularne mase. U ovom radu praćena je promjena masenog udjela 10 fenolnih kiselina (3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, 4-hidroksifeniloctena kiselina, vanilinska kiselina, kafeinska kiselina, siringinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, elaginska kiselina i *o*-kumarna kiselina) ovisno o trajanju fermentacije, te antioksidativna aktivnost ekstrakata pljevice ječma. Antioksidativna aktivnost određena je spektrofotometrijski DPPH metodom, a profil i koncentracija fenolnih kiselina u ekstraktima pljevice ječma određeni su UHPLC metodom. Biološka obrada pljevice ječma pozitivno je utjecala na povećanje ekstraktibilnosti fenolnih kiselina iz pljevice ječma. Dokazano je da je veći prinos fenolnih kiselina kao i antioksidacijska aktivnost postignuta u ekstraktima dobivenim biološkom obradom bez dodatka induktora. Od 10 fenolnih kiselina najbolja ekstraktibilnost je postignuta kod siringinske kiseline s ostvarenim najvećim prinosom nakon 1. dana fermentacije (0,083 mg/g<sub>s.t.</sub>). Najbolju antioksidacijsku aktivnost pokazali su ekstrakti koji nisu bili biološki obrađeni koja je iznosila 0,005g<sub>inhib.</sub> DPPH/g<sub>s.t.</sub> te je utvrđena slaba pozitivna korelacija između masenog udjela ukupnih fenolnih kiselina i antioksidacijske aktivnosti ( $R = 0,17$  za pokus bez dodatka induktora i  $R = 0,35$  za pokus s dodatkom induktora).

**Ključne riječi:** pljevica ječma, fermentacija na čvrstim nosačima, *Trametes versicolor*, fenolne kiseline

Ovaj diplomski rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost "Razvoj održivog integriranog procesa proizvodnje biološki aktivnih izolata iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije" (POPI-WinCEco) (IP-2018-01-1227)

**Rad sadrži:** Slika: 30

Stranica: 48

Literarnih referenci: 50

**Jezik izvornika:** Hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

1. predsjednik izv. prof. dr. sc. Marina Tišma
2. član-mentor prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić
3. član prof. dr. sc. Mirela Planinić
4. zamjena člana prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić

**Datum obrane:** 24. rujna 2019.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek

GRADUATE THESIS

Faculty of food technology Osijek

Department of process engineering, Subdepartment of Unit Operations

Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Unit Operations in Process Engineering

**Thesis subject:** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII held on May 30, 2019.

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

**Technical assistance:** Gordana Šelo, mag. ing.

### Influence of the Biological Treatment of Barley Husk with *Trametes versicolor* on the Extraction of Phenolic Acids

*Teo Lukačić*

#### Summary:

The aim of this study was to determine the influence of the biological treatment of barley husk on the extractability of phenolic acids in relationship to biologically untreated samples. Biological treatment was performed using the white rot fungus *Trametes versicolor* under solid-state fermentation conditions for 10 days with and without the addition of egg shell as an enzyme synthesis inducer. *Trametes versicolor* is a basidiomycota fungus that produces a mixture of lignolytic enzymes capable of degradation lignin and aromatic compounds into lower molecular weight compounds. In this paper, the goal was to follow the content of 10 phenolic acids (3,4-dihydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, ellagic acid and *o*-coumaric acid) during solid-state fermentation and the antioxidant activity of barley husk extracts. The antioxidant activity was determined spectrophotometrically by DPPH method, and the profile and content of phenolic acids in barley husks extracts were determined by the UHPLC method. Biological treatment of barley husk increased the extractability of phenolic acids from barley husk. It was proved that content of phenolic acids and antioxidant activity was higher in extracts of barley husk obtained by biological treatment without the addition of inducers. The best extractability was achieved with syringic acid with the highest yield obtained after day 1 of fermentation (0.083 mg/g<sub>db</sub>). Biologically untreated samples showed the highest antioxidant activity (0,005g<sub>inhib.</sub> DPPH/g<sub>db</sub>), and weak positive correlation between content of phenolic acids and antioxidant activity ( $R = 0.17$  for experiment without inducer and  $R = 0.35$  for experiment with inducer) was observed.

**Key words:** barley husk, solid-state fermentation, *Trametes versicolor*, phenolic acids

*Graduate thesis was supported by the Croatian Science Foundation under the project "Development of a sustainable integrated process for the production of bioactive isolates from food industry residues" (POPI-WinCEco) (IP-2018-01-1227)*

**Thesis contains:** Figures: 30

Pages: 48

References: 50

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

1. chair person Marina Tišma, PhD, associate prof.
2. supervisor Ana Bucić-Kojić, PhD, full prof.
3. member Mirela Planinić, PhD, full prof.
4. stand-in Daliborka Koceva Komlenić, PhD, full prof.

**Defense date:** 24<sup>th</sup> September 2019

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

*Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Ani Bucić-Kojić koja mi je pružila priliku izrade diplomskog rada. Veliko hvala na posvećenom vremenu, prenesenom znanju i pomoći pri izradi diplomskog rada!*

*Hvala asistentici Gordani Šelo na korisnim savjetima i vremenu koje je izdvojila za pomoć pri izvedbi eksperimentalnog dijela!*

*Izv. prof. dr. sc. Marini Tišmi i izv. prof. dr. sc. Mireli Planinić zahvaljujem na korisnim savjetima i vremenu koje su odvojile za bilo kakva pitanja i pomoć!*

*Hvala kolegama Martinu Potočniku, Robertu Šimunoviću i Ivanu Oršoliću koji su radili diplomski rad na istom projektu, te mi pomogli kada god je trebalo!*

*Posebna zahvala mojim roditeljima i bratu koji su mi pružili podršku tijekom cijelog studija!*

*Ovaj diplomski rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost "Razvoj održivog integriranog procesa proizvodnje biološki aktivnih izolata iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije" (POPI-WinCEco) (IP-2018-01-1227)!*

## SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.</b>	<b>Pljevica ječma</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2.</b>	<b>Fenolni spojevi</b> .....	<b>4</b>
2.2.1.	Fenolne kiseline .....	6
<b>2.3.</b>	<b>Gljiva bijelog truljenja</b> .....	<b>6</b>
2.3.1.	<i>Trametes versicolor</i> .....	8
<b>2.4.</b>	<b>Uzgoj <i>Trametes versicolor</i></b> .....	<b>9</b>
<b>2.5.</b>	<b>Fermentacija na čvrstim nosačima</b> .....	<b>11</b>
2.5.1.	Provedba fermentacije na čvrstim nosačima .....	12
2.5.2.	Bioreaktor za provođenje SSF:.....	15
<b>2.6.</b>	<b>Ekstrakcija</b> .....	<b>15</b>
2.6.1.	Ekstrakcija kruto-tekuće .....	16
<b>2.7.</b>	<b>Određivanje profila fenolnih spojeva HPLC metodom</b> .....	<b>16</b>
<b>2.8.</b>	<b>Antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata</b> .....	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1.</b>	<b>Zadatak</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.</b>	<b>Materijali i metode</b> .....	<b>19</b>
3.2.1.	Mikroorganizam .....	19
3.2.2.	Kemikalije .....	20
3.2.3.	Uređaji .....	20
3.2.4.	Uzgoj i čuvanje kulture .....	24
3.2.5.	Priprema uzorka za fermentaciju na čvrstim nosačima .....	24
3.2.6.	Obrada uzorka nakon provedene fermentacije .....	25
<b>3.3.</b>	<b>Analitičke metode</b> .....	<b>26</b>
3.3.1.	Određivanje koncentracije fenolnih kiselina UHPLC metodom .....	26
3.3.2.	Postupak izrade kalibracijskih krivulja za kvantitativnu analizu pojedinačnih fenolnih kiselina.....	27
3.3.3.	Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata pljevica ječma .....	29

<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>30</b>
4.1.	Određivanje suhe tvari.....	30
4.2.	Gubitak na masi uzorka .....	31
4.3.	3,4-dihidroksibenzojeva kiselina .....	32
4.4.	<i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina .....	33
4.5.	4-hidroksifeniloctena kiselina .....	34
4.6.	Vanilinska kiselina .....	35
4.7.	Kafeinska kiselina .....	36
4.8.	Siringinska kiselina .....	37
4.9.	<i>p</i> -kumarinska kiselina.....	38
4.10.	Ferulinska kiselina .....	39
4.11.	Elaginska kiselina .....	40
4.12.	<i>o</i> -kumarinska kiselina.....	41
4.13.	Antioksidativna aktivnost ekstrakata pljevice ječma .....	42
4.14.	Korelacija udjela fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti.....	43
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>46</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

### OZNAKE:

- $c$  – moljska koncentracija tvari (mM)
- $n$  – broj okretaja ( $\text{okr min}^{-1}$ )
- $t$  – vrijeme trajanja fermentacije (dan)
- $A$  – apsorbancija
- $T$  – temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
- $f$  – frekvencija (KHz)
- $V$  – volumen injektiranog uzorka za analizu na HPLC-u ( $\mu\text{L}$ )
- $m$  – masa (g)
- $C$  – maseni udio analizirane tvari u ekstraktu ( $\text{mg/g}_{\text{s.t.}}$ )
- $P$  – površina ispod pika

### KRATICE:

- AA – antioksidativna aktivnost
- DPPH - 2,2-difenil-1-pikirilhidrazil radikal
- E1 – eksperiment 1
- E2 – eksperiment 2
- HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotovitosti (eng. High-performance liquid chromatography)
- s.t. – suha tvar
- SmF – submerzna fermentacija
- SSF – fermentacija na čvrstim nosačima (eng. solid state fermentation)



## **1. UVOD**

Ječam je plod jednogodišnjih i dvogodišnjih biljaka iz porodice trava. Ubraja se u prosolike žitarice zajedno s pšenicom, zobi i raži, te se smatra jednom od najstarijih žitarica u Europi. Ječam se danas koristi u proizvodnji piva, kruha, brašna, te kao stočna hrana.

Pljevica ječma je proizvodni ostatak prehrambene i poljoprivredne industrije koji se dobije prilikom prerade ječma mljevenjem. Današnji biotehnološki postupci/procesi omogućuju obradu proizvodnih ostataka prehrambene industrije pri čemu se smanjuje količina neupotrebljivih sastojaka, a pritom se dobiju produkti koji se mogu korisno iskoristiti.

Jedan od takvih procesa je i fermentacija na čvrstim nosačima (eng. solid-state fermentacija, SSF) pomoću kojeg je moguće proizvesti različite visokovrijedne produkte (npr. enzimi, biogoriva, bioaktivne tvari) uz primjenu različitih mikroorganizama.

U navedenom procesu gljive bijelog truljenja zauzimaju važno mjesto budući da imaju sposobnost razgradnje i biokonverzije lignoceluloznog materijala, kakva je po svome sastavu i pljevica ječma, u visokovrijedne produkte.

Gljive bijelog truljenja proizvode smjesu izvanstaničnih lignolitičkih enzima koji se mogu koristiti u prehrambenoj industriji, farmaceutskoj industriji, industriji papira i pulpe, te brojnim drugim industrijama. Lignolitički enzimi imaju sposobnost razgradnje lignina i aromatskih spojeva u spojeve manje molekularne mase. Djelovanje lignolitičkih enzima temelji se na razbijanju aromatske strukture složenog prirodnog polimera lignina koji okružuje celulozu u lignoceluloznim materijalima (Šelo, 2014). Na produktivnost enzima osim dostupnih hranjivih tvari i uvjeta provedbe procesa pri uzgoju gljiva bijelog truljenja također utječu različiti induktori koji pospješuju proizvodnju enzima.

Žitarice su dobar izvor fenolnih kiselina jer fenolne kiseline sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta žitarica i mogu djelovati kao signalne molekule, štite ih od infekcija mikroorganizmima (antibiotsko djelovanje), privlače oprašivače, djeluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, pridonose pigmentaciji žitarica, dok u namirnicama pridonose boji, gorčini, okusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti (Berend i Grabarić, 2008). Zbog velikog udjela fenolnih kiselina, danas se žitarice koriste u velikom broju istraživanja.

Fenolne kiseline uz vitamine i minerale imaju važnu ulogu u prevenciji bolesti ljudi. Dokazana su protuupalna, protualergijska i protukancerogena djelovanja nekih fenolnih spojeva (Berend i Grabarić, 2008).

Neke od najpoznatijih i najbolje iskoristivih fenolnih kiselina su 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, 4-hidroksifeniloctena kiselina, vanilinska kiselina, kafeinska kiselina, siringinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, elaginska kiselina i *o*-kumarinska kiselina.

Cilj ovog rada je ispitati utjecaj biološke obrade proizvodnog ostatka ječma (pljevica) pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* – TV6 tijekom 10 dana na ekstraktibilnost fenolnih kiselina, uz dodatak i bez dodatka ljuske jajeta kao induktora sinteze enzima.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Pljevica ječma

Žitarice su najvažnije i najrasprostranjenije kultivirane biljke na svijetu te čine temelj zdrave prehrane (Mandić, 2007). Zbog niske cijene, lakog skladištenja, transportiranja, dugotrajnosti i otpornosti, njihov uzgoj se proteže diljem svijeta te zauzimaju preko 50% prehrambenih potreba u svijetu. U nerazvijenim zemljama (Afrika, središnja Azija, Južna Amerika) taj postotak prelazi i 80%.

Nutricionisti preporučuju konzumaciju žitarica tri puta dnevno. Najviše preporučuju brašno cjelovitih žitarica jer sadrže najvažnije nutritivne tvari u omotaču (Mandić, 2010; Ugarčić-Hardi, 2010a).

Ječam zauzima četvrto mjesto najznačajnijih ratarskih kultura, odmah iza pšenice, riže i kukuruza. Koristi se u pekarskoj industriji, u proizvodnji piva i slada, u industrijskoj preradi te u proizvodnji škroba i alkohola (Leskošek-Čukalović, 2002). Ječam je bogat izvor topljivih prehrambenih vlakana, minerala, vitamina, te fitokemikalija: fenola, flavonoida, karotenoida itd.

Izvor prehrambene vrijednosti je suhi jednosjemeni plod (zrno) koji sadrži prehrambene sastojke za razvoj i rast klice i mlade biljke. Plod se sastoji od: plodne i sjemene ovojnice (omotač), aleuronskog sloja, endosperma i klice. Zrno ječma može sadržavati pljevicu ili biti bez pljevice. Pljevica ječma sastoji se od celuloze i lignina kao glavnih dijelova, a ostatak čine pentozani, manani,  $\beta$ -glukani, a znatan je i udio silicija što daje pljevici abrazivna svojstva. Boja zrna s pljevicom je slamnato žuta dok je samo zrno bez pljevice bijele ili žućkaste boje (Slika 1).

Pljevica ječma u prehrambenoj industriji nema ulogu, te se svrstava u otpad odnosno proizvodni ostatak. U današnje vrijeme želi se iskoristiti što veća količina proizvodnih ostataka, a pljevica ječma zbog lignoceluloznog sastava predstavlja pogodan supstrat za rast i razvoj gljiva bijelog truljenja koje svojim rastom razgrađuju lignin, samim time smanjuju količinu otpada, a mogu utjecati i na povećanje prinosa i promjenu sastava fenolnih spojeva.



Slika 1: A) Zrno ječma bez pljevice

B) Zrno ječma s pljevicom (Ugarčić-Hardi, 2010b)

## 2.2. Fenolni spojevi

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

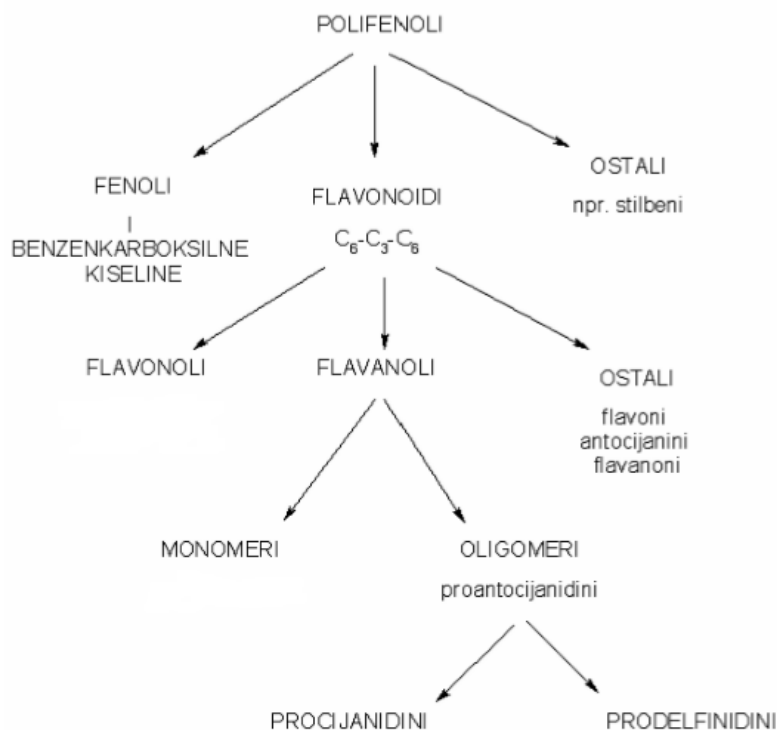
U prirodi se mogu naći u gotovo svim biljkama i namirnicama biljnog podrijetla. Polifenoli u biljkama sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka i mogu djelovati kao signalne molekule, štite biljke od infekcija mikroorganizmima (antibiotsko djelovanje), privlače oprašivače, djeluju kao zaštitni agensi od UV zračenja, pridonose pigmentaciji biljaka, dok u namirnicama pridonose boji, gorčini, okusu, mirisu i oksidativnoj stabilnosti (Berend i Grabarić, 2008).

Podatci iz literature govore kako polifenoli uz vitamine i minerale imaju važnu ulogu u prevenciji bolesti ljudi (Berend i Grabarić, 2008). Dokazana su protualergijska, protuupalna, i protukancerogena djelovanja nekih polifenolnih spojeva, kao i namirnica koje ih sadržavaju (Stratil i sur., 2005).

Flavonoidni spojevi pokazali su se kao najjači antioksidansi. Otkriveno je preko osamnaest flavonoida koji imaju veću antioksidacijsku učinkovitost od vitamina C i E. Antioksidacijska aktivnost polifenola pokazuje se u sposobnosti uklanjanja reaktivnih dušikovih i kisikovih molekula, ali i inhibiciji enzima koji povećavaju oksidacijski stres. Polifenoli također imaju sposobnost vezanja proteina i ugljikohidrata pomoću hidroksilnih skupina (Berend i Grabarić, 2008).

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

Na slici 3. prikazana je osnovna podjela polifenola. Iako se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, gledano s kemijskog stajališta, osnovna karakteristika svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova.



Slika 3. Osnovna podjela polifenolnih spojeva

### 2.2.1. Fenolne kiseline

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

Derivati benzojeve kiseline nazivaju se hidroksibenzojeve kiseline, iz koje nastaju direktno i prisutne su obično u slobodnom obliku, ali mogu biti i u obliku konjugiranih šećera, estera i organskih kiselina (Schuster i Hermann, 1985; Macheix i sur., 1990; Strack, 1997). U skupinu hidroksibenzojevih kiselina pripadaju: galna, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, protokatehinska, salicilna i gentizinska kiselina (Macheix i sur., 1990; Pereira i sur., 2009).

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

### 2.3. Gljiva bijelog truljenja

Mikroorganizmi (grč. mikros – malen; organismos – organizam) su organizmi koji se vide pod mikroskopom, premaleni su da bi se vidjeli golim okom. Možemo ih pronaći u svim dijelovima biosfere gdje je prisutna tekuća voda, uključujući dna oceana, vruće izvore, dubokim stjenovitim predjelima unutar zemljine kore, te visokim dijelovima atmosfere (Nester i sur., 2004).



Mikroorganizmi su karakteristični zbog male veličine svojih stanica, zbog čega su podijeljeni u zasebnu skupinu, odvojenu od životinja i biljaka. Mikroorganizmi kao razgrađivači imaju veliku ulogu u odvijanju procesa razgradnje i sinteze na zemlji. Prerađuju hranjive tvari koje su zaostale ugibanjem biljaka i životinja, te ih razgrađuju iz složenih oblika u jednostavne kemijske spojeve koje kasnije koriste fotosintetski organizmi. Zbog toga, mikroorganizmi imaju odlučujuću ulogu u biogeokemijskom ciklusu u koji pritječu hranjive tvari (nutrijenti) iz prirodne mreže hrane (Duraković, 1996).

Gljive pripadaju carstvu Fungi ili Mycota, koje predstavljaju višestanični i jednostanični eukarioti. Uključuju kvasce i plijesni, te skupinu makroskopskih organizama često zvanih mesnatim gljivama. Gljive su heterotrofni, nefotosintetski organizmi kojima stanična stijenka sastavljena od polisaharida hitina obavlja stanice. Karakteristike većine gljiva su dugačke, vlaknaste stanice hife koje svojim ispreplitanjem tvore micelij. Mogu se razmožavati i rasti na svim mjestima koje sadrže iskoristiv organski materijal, a najviše im odgovara vlažno i tamnije okruženje (Johnson, 1990).

Gljive truljenja mogu se podijeliti na gljive bijelog truljenja, gljive sivog truljenja i gljive blagog truljenja, a predstavljaju najrasprostranjenije razgrađivače drveta. Gljive bijelog truljenja su eukariotski mikroorganizmi koji se u prirodi mogu naći na trulom drveću i drvenom materijalu. Imaju sposobnost razgradnje biljnog polimera lignina i lignoceluloznih materijala, a uključuju razrede Basidiomycota i Ascomycota gdje nakon razgradnje lignoceluloznog materijala, materijal ostaje bijelo obojen, zbog čega su dobile naziv gljive bijelog truljenja. Trenutačno su jedini poznati mikroorganizmi koji su razvili kompletan enzimatski sustav za razgradnju lignina. Iako razgrađuju lignin, ne mogu ga koristiti kao izvor ugljika za njihov rast i razvoj te im je potreban drugi izvor ugljika, poput celuloze. Velika pažnja usmjerena je na njihovo istraživanje upravo zbog njihove sposobnosti da razgrađuju različite organske spojeve (Revankar i Lele, 2006; Gadd, 2001).

Lignin i celuloza spojevi su bogati ugljikom. U ekološkom ciklusu vrlo je važno da se ugljik može iskoristiti kako bi ciklus stalno cirkulirao. Zbog toga, gljive bijelog truljenja imaju važnu ulogu u ekološkom sustavu, jer omogućuju razgradnju lignina i lignoceluloznih materijala (Johnson, 1990).

Gljive bijelog truljenja luče izvanstanične lignolitičke enzime koji imaju mogućnost razaranja složene strukture lignina i na taj način oslobađaju celulozu koja se kasnije koristi kao izvor ugljika i energije za razmnožavanje i rast (Gadd, 2001). Gljive bijelog truljenja prilikom rasta napadaju lignin, dok celulozu lagano oštećuju i zbog toga se nazivaju selektivni razlagači jer celulozu ostavljaju neoštećenom, a lignin razgrađuju (Pilaš, 2009).

### 2.3.1. *Trametes versicolor*

*Trametes versicolor*, poznata i pod nazivima *Coriolus versicolor* i *Polyporus versicolor*, je gljiva bijelog truljenja iz razreda *Basidiomycetes* (Slika 2.). U prirodi se može pronaći u različitim bojama, zbog čega je dobila ime (lat. *trametes* – mršav; *versicolor* – u više boja). Izgledom podsjeća na puranov rep zbog čega je u SAD-u nazivaju Turkey Tail (Webster i Weber, 2007).



Slika 2. Primjeri različitog izgleda *Trametes versicolor* (<https://www.first-nature.com/fungi/trametes-versicolor.php>, 24.04.2019.)

Raste na posiječenim trupcima stabala (Lorenzo i sur., 2001), na stabljikama i otpalim granama drveta. Rasprostranjena je široko u prirodi, a razni sojevi ovog mikroorganizma koriste se u svrhu proizvodnje izvanstaničnih lignolitičkih enzima mangan peroksidaze, lignin peroksidaze, avicelulaze, celulaze, te najviše lakaze (Tavares i sur., 2005; Singh, 2006; Desai i Nityanand, 2011).

Lignolitički enzimi učinkovito razgrađuju lignin, mješavinu polikloriranih bifenila, policikličke aromatske ugljikovodike i brojne sintetske boje. Nedostatkom hranjivih stvari ili prisutnošću neke fenolne komponente u hranjivom mediju može se stimulirati proizvodnja enzima iz gljive bijelog truljenja. Povećanje produktivnosti proizvodnje lignolitičkih enzima može potaknuti dodatak induktora (Gadd, 2001; Xavier i sur., 2007).

*T. versicolor* učinkovito provodi delignifikaciju, obezbojenje izlaznih tokova nastalih izbjeljivanjem pulpe te izbjeljivanje i omekšavanje pulpe. Zbog toga *T. versicolor* ima veliku primjenu u industriji papira i pulpe, čime se želi izbjeći upotreba organskih ili anorganskih kiselina i drugih kemikalija koje su štetne za okoliš (Young i Masood, 1998).

## **2.4. Uzgoj *Trametes versicolor***

Dva osnovna načina uzgoja gljiva bijelog truljenja su:

- solid-state fermentacija (SSF)
- submerzna fermentacija (SmF)

Glavna razlika između ove dvije tehnike je u količini slobodne tekućine prisutne u sustavu. Rast mikroorganizama na čvrstom materijalu bez prisustva vode ili uz vrlo malu količinu vode odgovara SSF, dok kod submerznog uzgoja mikroorganizmi rastu u tekućoj hranjivoj podlozi (Desai i Nityanand, 2011).

Istraživanja u industriji proizvodnje fungalnih enzima pokazala su da se SSF-om, u usporedbi sa SmF-om, postiže veća produktivnost, manja je sklonost problemima inhibicije supstratom, veća stabilnost enzima pri višim temperaturama i pH. Osim toga, vrijeme SSF- a je kraće i degradacija proizvedenih enzima nepoželjnim proteazama je minimalna (Desai i Nityanand, 2011; Toca-Herrera i sur., 2007)

Prednosti fermentacije na čvrstim nosačima u odnosu na submerzni uzgoj:

- jednostavnost procesa i izvedbe bioreaktora;
- veći prinos proizvoda;
- veća otpornost na kontaminaciju (zbog nižeg aktiviteta vode);
- bolja i ekonomičnija aeracija;
- uvjeti uzgoja slični prirodnom staništu mikroorganizama;
- mala potrošnja energije;
- inokulacija sporama olakšava jednoliko raspršivanje inokuluma unutar supstrata;
- često jednostavnije izdvajanje proizvoda;
- jednostavna obrada ostatka nakon fermentacije;
- ostatak nakon fermentacije može se koristiti kao stočna hrana ili gnojivo (Ali i Zulkali, 2011; Couto i Sanroman, 2006; Mussatto i sur., 2012; Pejin, 2003).

Nedostaci fermentacije na čvrstim nosačima u odnosu na submerzni uzgoj:

- heterogenost sustava zbog otežanog miješanja (otežano mjerenje pH, temperature, relativne vlažnosti, koncentracije kisika i koncentracije biomase);
- formiranje vrućih točaka (eng. hot spots) kao posljedica disanja i metabolizma mikroorganizma;
- moguće upotrijebiti samo mikroorganizme koji rastu pri nižim aktivitetima vode;
- često je potrebna predobrada supstrata (rezanje, mljevenje, homogenizacija, hidroliza);
- potreban veći volumen inokuluma;
- proces dugo traje (Ali i Zulkali, 2011; Couto i Sanroman, 2006; Mussatto i sur., 2012; Pejin, 2003).

## 2.5. Fermentacija na čvrstim nosačima

Procesi pri kojima mikroorganizmi rastu na vlažnim čvrstim nosačima naziva se fermentacija na čvrstim nosačima (eng. solid-state fermentation, SSF). Čvrsti nosači istovremeno mogu biti i supstrati za rast mikroorganizama. Zbog kompatibilnosti uvjeta za odvijanje fermentacija na čvrstim nosačima i metabolizma filamentoznih gljiva, upravo se one najčešće koriste kao radni mikroorganizam u navedenim procesima. Fermentacije na čvrstim nosačima pronašle su svoju primjenu u obradi poljoprivredno-industrijskih ostataka zbog male količine nastale otpadne vode, malih energetskehtjeva, te ekološkog zbrinjavanja krutog otpada (Pandey, 2003).

Za biološku razgradnju lignoceluloznog otpadnog materijala sve češće se koriste fermentacije na čvrstim nosačima upotrebom gljiva bijelog truljenja kao radnog mikroorganizma. Gljive bijelog truljenja proizvode niz enzima koji mogu razgraditi lignin, hemicelulozu i celulozu, pripremajući na taj način materijal za daljnju biotehnološku proizvodnju (Tišma i sur., 2013). Fermentacije na čvrstim nosačima provode se na dvije vrste nosača:

- inertni, koji služe samo kao nosač (vlakna);
- neinertni, koji služe i kao nosač i kao supstrat (lignocelulozni materijali).

Vrste nosača karakterizira velika površina po jedinici volumena. Laganim miješanjem i laganom kompresijom ne dolazi do njihovog mehaničkog oštećenja, odnosno zadržavaju svoju strukturu. Prostor između čestica nosača uglavnom je ispunjen plinovitom fazom te manjim dijelom vodenom fazom u obliku tankog filma ili sitnih kapljica. Budući da je većina vode apsorbirana u čvrstom matriksu, slobodna voda može se naći u vrlo malim količinama, ili se fermentacija odvija u odsustvu slobodne vode (Mitchell i sur., 2006; Raimbault, 1998).

Karakteristike fermentacija na čvrstim nosačima:

- raspodjela i rast mikroorganizama te nastajanje produkata metabolizma odvijaju se na površini čvrstih nosača;

- hranjiva podloga nije homogena i ne može se lako miješati (potrebna specifična oprema);
- sadržaj slobodne vode je nizak, a ovisi o fizikalnim i kemijskim osobinama čvrstih nosača;
- aeraciju kroz sloj čvrstih nosača teško je provesti te se ona svodi na strujanje zraka po površini;
- tijekom procesa razvija se toplina pri čemu dolazi do povećanja temperature u sloju čvrstih nosača i smanjenja sadržaja vlage;
- čvrsti nosači imaju veliku površinu po jedinici volumena ( $10^3 - 10^6 \text{ m}^2 / \text{cm}^3$ ) (Pejin, 2003; Raimbault, 1998).

### **2.5.1. Provedba fermentacije na čvrstim nosačima**

Fermentacija na čvrstim nosačima ovisi o brojnim procesnim parametrima (areacija, pH, vrsta i soj mikroorganizma, mješanje i dr.). Osnovni princip provedbe SSF-a uključuje:

1. Priprema inokuluma
2. Priprema supstrata
3. Priprema bioreaktora
4. Inokulacija i punjenje bioreaktora
5. Kontrola i upravljanje procesom
6. Pražnjenje bioreaktora
7. Metode izdvajanja proizvoda
8. Zbrinjavanje nastalog otpada (Mitchell i sur., 2006.).

#### **1. Priprema inokuluma**

Priprema inokuluma ovisi o vrsti radnog mikroorganizma. U većini fermentacija na čvrstim nosačima koriste se filamentozne gljive kao radni mikroorganizam. Cilj ovog koraka je uzgojiti dostatnu količinu inokuluma visoke mikrobiološke aktivnosti (Mitchell i sur., 2006).

## **2. Priprema supstrata i bioreaktora**

Supstrat je često potrebno usitniti (rezanjem, mljevenjem ili na neki drugi način). Ponekad je supstratu potrebno dodati vodu i nutrijente ili izvršiti predobradu supstrata kako bi se povećala dostupnost nutrijenata. Supstrat je često potrebno sterilizirati ili pasterizirati (ovisno o stupnju aseptičnosti koju proces zahtijeva) izvan bioreaktora, iako je poželjnije ovaj korak provesti unutar bioreaktora. Bioreaktor je potrebno sterilizirati prije dodavanja supstrata čime se sprječava kontaminacija neželjenim mikroorganizmima tijekom SSF procesa (Mitchell i sur., 2006).

## **3. Inokulacija i punjenje bioreaktora**

Inokulacija se može provesti prije ili nakon punjenja bioreaktora. Ako se sloj supstrata ne može promiješati unutar bioreaktora, inokulacija se provodi izvan bioreaktora. U suprotnom, inokulacija se provodi raspršivanjem inokuluma iznad sloja supstrata tijekom miješanja. Ako je supstrat potrebno sterilizirati ili pasterizirati te inokulirati izvan bioreaktora, punjenje je potrebno provesti vrlo oprezno kako bi se spriječio ili minimizirao unos kontaminanata (Mitchell i sur., 2006).

## **4. Kontrola i upravljanje procesom**

Kontrola i upravljanje procesom ovise o konstrukciji bioreaktora, no glavni zadatak je regulacija protoka, temperature ulaznog zraka, brzine miješanja sloja supstrata i temperature rashladne vode kako bi se kontrolirali ključni parametri fermentacije (temperatura sloja supstrata, aktivitet vode, koncentracija otopljenog kisika, itd.) i održavale njihove optimalne vrijednosti za rast mikroorganizma i nastajanje proizvoda (Mitchell i sur., 2006).

## **5. Pražnjenje bioreaktora**

Izdvajanje proizvoda može se provesti unutar bioreaktora ili izvan njega. U svakom slučaju, cjelokupni sadržaj mora se ukloniti iz bioreaktora (Mitchell i sur., 2006).

## 6. Metode izdvajanja proizvoda

Ovisno o procesu, cjelokupni sadržaj bioreaktora predstavlja produkt ili se pak produkt izdvaja iz smjese fermentiranog supstrata i biomase radnog mikroorganizma i zatim pročišćuje. Prilikom izdvajanja produkta iz sadržaja bioreaktora ili iz biomase, primjenjuju se različite metode separacije (filtracija, centrifugiranje), razaranja stanica (fizikalne, kemijske i biološke metode), pročišćavanja (koncentriranje, ekstrakcija, ultrafiltracija, adsorpcija, taloženje), operacije visokog stupnja razdvajanja (kristalizacija, kromatografija, elektroforeza) te sušenje (konvekcijsko, kontaktno, raspršivanjem, liofilizacija) (Mitchell i sur., 2006, Marić i Šantek, 2009).

## 7. Zbrinjavanje nastalog otpada

U nekim slučajevima, kruti otpadni materijal može se koristiti kao proizvod (hrana ili krmivo), no često zaostaje kruti ostatak koji je potrebno zbrinuti na adekvatan način (Mitchell i sur., 2006).

Slika 4. Prikazuje rast *Trametes versicolor* na pljevici ječma.



Slika 4. *Trametes versicolor* na pljevici ječma



### **2.5.2. Bioreaktor za provođenje SSF**

Fermentacije na čvrstim nosačima u laboratorijskim uvjetima obično se provode u Petrijevim zdjelicama, Rouxovim bočicama, Erlenmeyerovim bočicama, staklenkama i ostalom staklenom posuđu. Ovakvi eksperimenti lako se provode jer su jednostavni. Bioreaktor osigurava odvijanje SSF u kontroliranim uvjetima, sprječavanje kontaminacije sloja supstrata nepoželjnim okolnim mikroorganizama, te sprečava otpuštanje mikroorganizama u okolinu. Tijekom procesa važno je pratiti i kontrolirati ključne parametre, poput temperature sloja supstrata i aktiviteta vode. Postizanje ustaljenosti optimalnih vrijednosti navedenih parametara ključno je za rast mikroorganizama i nastanak proizvoda (Tišma i sur., 2014).

### **2.6. Ekstrakcija**

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

1. Ekstrakciju kruto-tekuće (ekstrakcija otapalom) – prijenos tvari se odvija iz krute faze, a ukoliko se provodi otapalom koje nije lako hlapljivo često se naziva i izluživanje:
2. Ekstrakcija tekuće-tekuće – prijenos tvari se odvija iz tekuće faze. Ovaj tip ekstrakcije se obično naziva ekstrakcija u užem smislu (Floros i sur., 1999).

### **2.6.1. Ekstrakcija kruto-tekuće**

Kruto-tekuća ekstrakcija je najčešće korištena operacija izolacije aktivnih supstanci iz biljnog materijala. Kruto-tekuća ekstrakcija predstavlja operaciju izdvajanja jedne ili više komponenti iz čvrstog materijala uz pomoć odgovarajućeg otapala u nekoliko koraka: ulazak otapala u krutu tvar, otapanje komponenti, transport otapala s otopljenom tvari na površinu krute tvari, transport otopine s površine krute tvari u glavnu masu otopine, razdvajanje ekstrakta i krutog ostatka uzorka (Bucić-Kojić, 2008).

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

## **2.7. Određivanje profila fenolnih spojeva HPLC metodom**

Za analizu fenolnih spojeva uobičajeno se koristi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC (Slika 5). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. High-Performance Liquid Chromatography) oblik je kromatografije na stupcu i koristi se u analitičkoj kemiji. Ponekad se u literaturi može pronaći i naziv „Tekućinska kromatografija pod visokim tlakom“ (eng. High pressure liquid chromatography – HPLC). Pod utjecajem visokog tlaka u sustavu, uzorak je nošen pokretnom (mobilnom) fazom preko stacionarne faze u koloni. Komponente uzoraka različito se zadržavaju na koloni, što ovisi o specifičnim fizičkim i kemijskim interakcijama. Vrijeme potrebno da tvar dođe do kraja stupca zove se retencijsko vrijeme i karakteristično je za svaku pojedinu tvar, ali uvelike ovisi i o stacionarnoj fazi te sastavu mobilne faze (Skoog i sur., 1999).



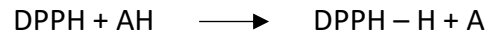
Slika 5. UHPLC uređaj

## 2.8. Antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata

Antioksidativna aktivnost polifenolnih spojeva ovisi o njihovoj sposobnosti da otpuste vodik ili elektron te sposobnosti delokalizacije nesparenog elektrona u aromatskoj strukturi (Villaño i sur., 2004).

Fenolni spojevi, kao antioksidansi moraju zadovoljiti dva uvjeta. Prvi uvjet je da moraju usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije, ako su prisutni u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji. Drugi uvjet uključuje da nastali radikal mora biti stabilan, kako ne bi poticao lančanu reakciju. Radikali se stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili reakcijom s drugim lipidnim radikalom. Također, interakcijom polifenola s drugim fiziološkim antioksidansima postiže se sinergijski učinak i povećanje antioksidativne aktivnosti (Kazazić, 2004.). Postoji više metoda koje se uobičajeno koriste za određivanje *in vitro* antioksidacijske aktivnosti ekstrakata, a jedna od njih je DPPH metoda. Ova metoda često se koristi zbog jednostavnosti i brzine izvođenja, te zbog stabilnosti DPPH• radikala. Zbog delokalizacije slobodnog elektrona preko cijele molekule DPPH• radikal je stabilan zbog čega molekula ne dimerizira, za razliku od većine drugih slobodnih radikala (Bucić-Kojić, 2008).

Metoda se temelji na redukciji sintetičkog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH·) otopljenog u alkoholnoj otopini u prisustvu antioksidansa (AH) koji donira jedan atom vodika i "hvata" slobodni DPPH· radikal pri čemu nastaje neradikalni oblik DPPH-H i stabilizirani fenoksi radikal (A·) kako slijedi (Benvenuti i sur., 2004):



Pri redukciji DPPH· radikala u određenom vremenu dolazi do smanjenja apsorbancije (mjerene pri 515 nm) reakcijske otopine zbog smanjenja koncentracije zaostalog slobodnog DPPH· radikala, što se očituje u promjeni ljubičaste boje otopine prema blijedo ljubičastoj boji. Količina inhibiranog DPPH· radikala dokazuje veću ili manju antioksidacijsku aktivnost ispitivanog uzorka.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Zadatak

Zadatak rada bio je ispitati utjecaj biološke obrade pljevice ječma na ekstraktibilnost fenolnih kiselina u odnosu na biološki neobrađene uzorke. Biološka obrada uzoraka provedna je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor*, uz dodatak i bez dodataka ljuske jajeta (induktora) tijekom 10 dana.

Tijekom biološke obrade pljevice ječma praćen je gubitak na masi uzorka te koncentracija fenolnih kiselina i antioksidacijska aktivnost ekstrakata pripremljenih kruto-tekućom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom.

### 3.2. Materijali i metode

#### 3.2.1. Mikroorganizam

U ovom radu korišten je soj mikroorganizama *Trametes versicolor* TV-6 (MZKI, Ljubljana, Slovenija; Slika 6) koji je uzgojen na krumpir- deksstroza agaru.



Slika 6. *Trametes versicolor* TV-6

### 3.2.2. Kemikalije

Korištene su sljedeće kemikalije: Krumpir-dekstroza agar (Biolife, Milan, Italija), octena kiselina, ledena, 99,5% (Macron fine chemicals, Njemačka), Acetonitril (J.T.Baker, Nizozemska), Metanol (J.T.Baker, Nizozemska), Etanol (Gram mol, Zagreb, Hrvatska), DPPH (Sigma Aldrich, SAD), 3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina, 97%(Acros Organics, Francuska), *p*-Hidroksibenzojeva kiselina, 99%(Aldrich Chemistry, SAD), *p*-Hidroksifeniloctena kiselina(Aldrich Chemistry, SAD), Vanilinska kiselina, 97%(Acros Organics, Francuska), Kafeinska kiselina(Sigma Aldrich, SAD), Siringinska kiselina, 95%(Sigma Aldrich, SAD), *p*-Kumarinska kiselina(Sigma Aldrich, SAD), Ferulična kiselina, 99%(Aldrich Chemistry, SAD) Elaginska kiselina(Sigma Aldrich, SAD), *o*-Kumarna kiselina(Sigma Aldrich, SAD).

### 3.2.3. Uređaji

#### Autoklav

Sterilizacija korištenog laboratorijskog posuđa, pribora i potrebnih otopina kao i samog susprata prije i nakon SSF-a provođena je u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd; Slika 7) pri temperaturi 121 °C tijekom dvadeset minuta.



Slika 7. Autoklav

## Inkubator

SSF se provodio pri 27 °C tijekom 10 dana u teglicama smještenim u inkubatore (Binder, Njemačka; Slika 8) koji su opremljeni s ventilatorom.



Slika 8. Inkubatori

## Mlin

Nakon SSF procesa, uzorci su samljeveni u ultracentrifugalnom mlinu na veličinu čestica od 1 mm (ZM 200, Retsch, Njemačka; Slika 9).



Slika 9. Mlin ZM 200



### Uređaj za mjerenje suhe tvari

Udio suhe tvari u uzorcima određivan je svakog dana tijekom i nakon SSF procesa brzom termogravimetrijskom metodom pomoću uređaja za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo, Švicarska; Slika 10).



Slika 10. Uređaj za radijacijsko-infracrveno sušenje HR-73, Mettler Toledo

### Ultrazvučna kupelj

Elmasonic P (Elma, Švicarska ; Slika 11) je ultrazvučna kupelj koja se koristila za provođenje ekstrakcije. Ekstrakcija se provodila 10 minuta pri 80 °C, uz 40 %-tnu snagu i 37kHz u sweep modu pomoću 20 ml 50%-tne vodene otopine etanola



Slika 11. Ultrazvučna kupelj

## Centrifuga

Ekstrakti su se prije analiziranja na UHPLC centrifugirani (Hermle Z 326K Njemačka; Slika 12) 10 minuta pri 10 000 okr min<sup>-1</sup>.



Slika 12. Centrifuga

## Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC)

Maseni udio fenolnih kiselina određivan je na tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (*Nexera XR*, Shimadzu, Japan, Slika 13) koji je spojen na računalo. Za analizu fenolnih spojeva korištena je Kinetex® C18 phenomenex (100 x 4,6mm) kolona i PDA detektor (SPD-M20A). Analiza je provedena na 30 °C, pri protoku od 1 ml/min uz injektiranje 20 µl uzorka. Kao Eluent A korišten je acetonitril : metanol (50:50), a kao eluent B je korištena 1%-tna otopina octene kiseline.



Slika 13. UHPLC spojen na računalo

### **Spektrofotometar**

Spektrofotometar (Shimadzu, Japan, Slika 14UV-1280 PharmaSpec) korišten je za mjerenje antioksidativne aktivnosti pri valnoj duljini od 515nm.



Slika 14. Spektrofotometar

### **3.2.4. Uzgoj i čuvanje kulture**

Izvagano je 21 g krumpir-dekstroza agara i dodano je 500 ml destilirane vode, zagrijano do vrenja i sterilizirano u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta, nakon čega je podloga ohlađena na temperaturu od 30 °C do 35 °C. Ohlađena podloga je dobro promiješana te prelivena u sterilne Petrijeve zdjelice. Nacjepljivanje mikroorganizama provodili se u potezu nakon što se podloga skrutnula. Inkubacija je trajala sedam dana pri 27 °C.

### **3.2.5. Priprema uzorka za fermentaciju na čvrstim nosačima**

Priprema uzorka za fermentaciju pljevice ječma bez dodatka induktora provodila se tako da se u teglici pomiješalo 50 g uzorka sa 60 ml vode. Dobro promiješana teglica stavila se na sterilizaciju u autoklav na 121 °C kroz 20 minuta. Nakon što su se teglice s uzorkom ohladile na sobnu temperaturu u teglicu s uzorkom dodano je 10 ml suspenzije spora *Trametes versicolor* u prethodno steriliziranoj vodi. Spore *Trametes versicolor* dodane su steriliziranu vodu u obliku 5 plagova promjera 9 mm.

Priprema uzorka za fermentaciju pljevice ječma s dodatkom induktora provodila se tako da se u teglici pomiješalo 45 g uzorka s 5 g samljevene ljuske jajeta i 60 ml vode. Dobro promiješana teglica stavila se na sterilizaciju u autoklav na 121 °C kroz 20 minuta. Nakon što su se teglice s uzorkom ohladile na sobnu temperaturu u teglicu s uzorkom dodano je 10 ml suspenzije spora *Trametes versicolor* i prethodno sterilizirane vode.

Teglice su se pokrile papirom propusnim za zrak (Slika 15) i stavile na inkubaciju kroz 10 dana pri 20 °C u inkubator.



Slika 15. Nacjepljena pljevica ječma s *T. versicolor* stavljena na inkubaciju

### 3.2.6. Obrada uzorka nakon provedene fermentacije

Nakon završene SSF, uzorci su sterilizirani kako bi se zaustavio rast mikroorganizama i sam proces. Nakon toga, uzorci su vagani kako bi se vidio gubitak na masi kroz određeni dan. Uzorci su prije mljevenja i ekstrakcije sušeni na sobnoj temperaturi tijekom 48 sati.

### 3.3. Analitičke metode

#### 3.3.1. Određivanje koncentracije fenolnih kiselina UHPLC metodom

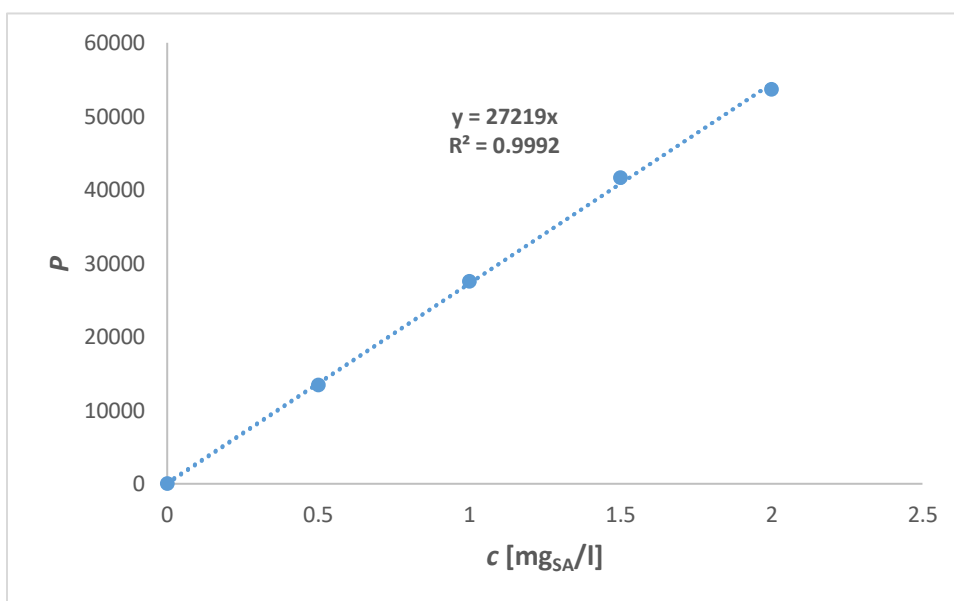
1,5 g samljevenog uzorka pljevice ječma podvrgnut je procesu ekstrakcije s 20 ml 50%-tnog etanola na ultrazvučnij kupelji kroz 10 minuta pri 80 °C, sa snagom od 40 % i 37 kHz u sweep modu.

Navedeni uvjeti su korišteni budući da su se u preliminarnim istraživanjima pokazali kao optimalni za postizanje najvećeg prinosa fenolnih kiselina. Uzorak je zatim stavljen na centrifugu na 10 000 okr/minuti kroz 10 minuta kako bi se odvojili tekući i kruti dio. Tekući dio - ekstrakt služio je za analizu na UHPLC-u. Prije stavljanja na UHPLC, ekstrakti su profiltrirani na mikrofilteru (45 µm) u vialice iz kojih je ekstrakt uzorkovan tijekom UHPLC analize.

Ekstrakti biološki obrađenih uzoraka pljevice ječma dali su kromatograme koji su korišteni za kvalitativnu i kvantitativnu analizu fenolnih kiselina u uzorcima. Kvalitativna analiza (identifikacija komponenti) je provedena usporedbom retencijskih vremena pojedinačnih fenolnih kiselina u uzorku s retencijskim vremenima nakon injektiranja poznatog standarda fenolne kiseline određene koncentracije u uzorku. Kvantitativna analiza fenolnih kiselina u uzorcima provedena je pomoću odgovarajućeg softvera za obradu podataka (*LabSolution*), određivanjem površine ispod pikova na temelju prethodno izrađenih kalibracijskih krivulja. Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih fenolnih kiselina određena je u dva ponavljanja (Šibalić, 2016).

### 3.3.2. Postupak izrade kalibracijskih krivulja za kvantitativnu analizu pojedinačnih fenolnih kiselina

Za izradu kalibracijskih krivulja pripremljene su temeljne otopine standarda za fenolne kiseline u koncentraciji 10 mg/ml (500 mg standarda otopljeno u 50 ml redestilirane vode). Od temeljnih otopina pripremljene su sljedeće koncentracije za svaku pojedinu otopinu pojedinačnih fenolnih kiselina u koncentracijama 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; 2,0 mg/l. Na slici 16. prikazana je kalibracijska krivulja siringinske kiseline koja prikazuje ovisnost površine ispod pika o koncentraciji siringinske kiseline. Povećanjem koncentracije siringinske kiseline dolazi do porasta površine ispod pika. Na istom principu rađene su kalibracijske krivulje preostalih 9 fenolnih kiselina.



Slika 16. Kalibracijska krivulja Siringinske kiseline

Nakon provedene tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti određena je površina ispod pikova na dobivenim kromatogramima. Linearna ovisnost površine ispod pikova o promjeni koncentracije određene fenolne kiseline procijenjena je linearnom regresijskom analizom pomoću regresijskog modela najmanjih kvadrata pri čemu je dobivena jednadžba:

$$y = 27219 x \quad (1)$$

odnosno:

$$c \text{ (siringinske kiseline)} = 27219 \cdot P \text{ [mg/l]} \quad (2)$$

koja je korištena za izračunavanje masene koncentracije fruktoze u ekstraktima kukuruzne silaže.

Prema jednadžbama (1 i 2) dobivenih metodom linearne regresije izračunate su koncentracije pojedinačnih fenolnih kiselina u ekstraktima pljevice ječma koje su preračunate na suhu tvar uzoraka prema navedenom izrazu:

$$C = \frac{c \cdot V_e}{m_{uz} \cdot w_{s.t.}} \cdot 100 \quad (3)$$

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

$c$  – masena koncentracija analizirane tvari u ekstraktu (mg/l)

$V_e$  – ukupni volumen dobivenog ekstrakta (l)

$m_{uz}$  – masa uzorka (g)

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

### 3.3.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata pljevice ječma

U 0,1 ml ekstrakta pljevice ječma dodano je 3,9 ml otopine DPPH sa 96%-tnim etanolom (0,026 mg DPPH/ml). Otopina je ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi na tamnom mjestu. Nakon 30 minuta otopini je mjerena apsorbancija ( $A_{\text{ekst.}}$ ) na spektrofotometru pri valnoj duljini od 515 nm u odnosu na slijepu probu (96% etanol).

Inhibicija DPPH· uslijed antioksidacijske aktivnosti (AA) ispitivanih ekstrakata izračunata je u postotku (%) prema sljedećem izrazu (Benvenuti i sur., 2004):

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = \left[ \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{eks.}}}{A_{\text{DPPH}}} \right] \times 100$$

Za kompleksne sustave kao što su biljni ekstrakti preporučuje da se rezultati izraze po masi materijala. Postotak (%) inhibiranog DPPH· radikala preračunat je na masu inhibiranog DPPH izraženu po masi suhe tvari pljevice ječma odnosno:

$$AA = \frac{m_{\text{inh.DPPH}}}{m_{\text{s.t.}}} \quad [\text{g inh.DPPH/g s.t.}]$$



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Biološka obrada pljevice ječma provedna je s gljivom bijelog truljenja *Trametes versicolor* TV-6 u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima tijekom 10 dana pri 27 °C. Eksperimenti su provedeni uz početnu pretpostavku da gljiva bijelog truljenja *T. versicolor* tijekom rasta na pljevici ječma sintetizira enzime koji razgrađuju lignoceluloznu strukturu oslobađajući jednostavnije spojeve čineći ih dostupnijim za ekstrakciju.

Provedena su dva seta eksperimenata i to jedan s dodatkom i jedan bez dodatka induktora sinteze enzima. U ovom radu kao induktor dodavana je mljevena ljuska jajeta (10% na ukupnu masu odnosno na masu supstrata + induktor). Eksperimenti s dodatkom induktora provedeni su s ciljem ispitivanja utjecaja induktora na povećanu sintezu lignolitičkih enzima koji posljedično mogu utjecati na razgradnju složene lignocelulozne strukture i oslobađanje fenolnih kiselina. U ovom radu nisu prikazane aktivnosti enzima, nego samo utjecaj dodatka induktora na udio ekstrahiranih fenolnih kiselina.

Početna vlažnost svih uzoraka bila je podešena na 60% budući da je za rast gljiva bijelog truljenja i njezin metabolizam u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima potrebna vlažnost supstrata od 60-80%.

Biološki obrađeni uzorci u oba seta eksperimenata su pripremana na isti način za određivanje fenolnih kiselina što je uključivalo postupak sušenja, mljevenja, ekstrakcije, kvalitativnu i kvantitativnu analizu ekstrakata UHPLC metodom. Isto tako, svim ekstraktima određena je i antioksidacijska aktivnost te mjerenje gubitka mase supstrata nakon biološke obrade.

Pokusi su provedeni u dva paralelna ponavljanja te su sve vrijednosti prikazane kao srednje vrijednosti. Rezultati biološke obrade uspoređivani su početnim uzorkom koji nije biološki obrađen ("nulti dan").

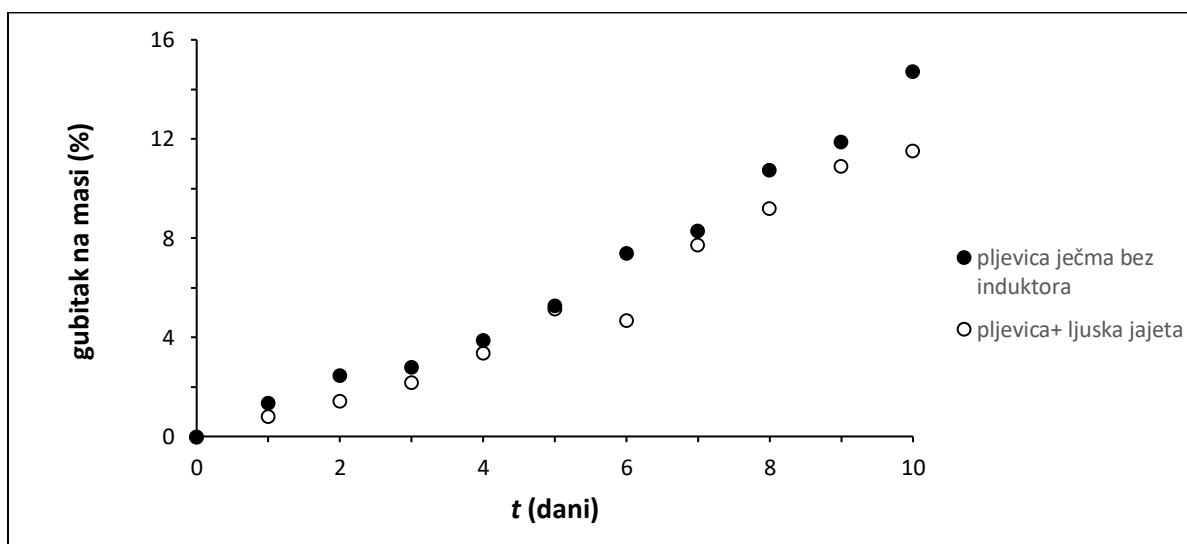
Nakon provedenih istraživanja, eksperimentalno dobiveni podatci i rezultati njihove obrade prikazani su u dijagramima. Obrada podataka provedna je u Excel programu.

#### **4.1. Određivanje suhe tvari**

Nakon sušenja uzorka u trajanju od 48 h na zraku određena je suha tvar. Udio suhe tvari u biološki neobrađenoj pljevici ječma kretao se u rasponu od 87,24% do 96,05%. Udio suhe tvari u biološki obrađenoj pljevici ječma kretao se u rasponu od 87,33% do 95,62%.

## 4.2. Gubitak na masi uzorka

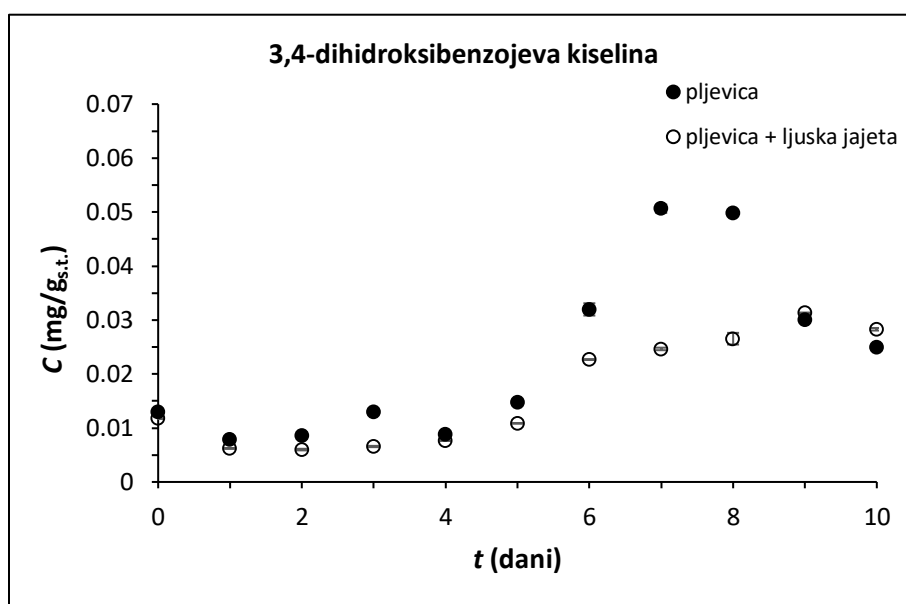
Slika 17. prikazuje ovisnost gubitka mase supstrata o trajanju SSF-a tijekom 10 dana. U pokusu bez dodatka induktora, gubitak na masi kroz 10 dana iznosi 14,74%, dok kod pokusa s dodatkom induktora gubitak na masi iznosi 11,53%. Vidljivo je da se vremenom trajanja SSF-a povećavao gubitak na masi. Uočen je isti trend gubitka na masi i u slučaju dodatka induktora i bez dodatka induktora, s tim da su gubitci na masi u slučaju dodatka induktora bili nešto niži u odnosu na SSF bez dodatka induktora. Razlog tome može biti to je što je kod pokusa s induktorom dodano 10% ljuske jajeta, koja služi kao induktor, *T. versicolor* ga ne koristi za ishranu, već joj služi samo kao induktor rasta i sinteze enzima. Dobiveni rezultati pokazuju da se gljiva bijelog truljenja *T. versicolor* osim za dobivanje visokovrijednih spojeva može koristiti i za minimiziranje otpada, budući da tijekom svog rasta troši nutijente iz supstrata, te ga razgrađuje i smanjuje njegovu količinu.



Slika 17. Ovisnost gubitka mase supstrata tijekom biološke obrade pljevice ječma s *T. versicolor* o trajanju biološke obrade (t)

### 4.3. 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina

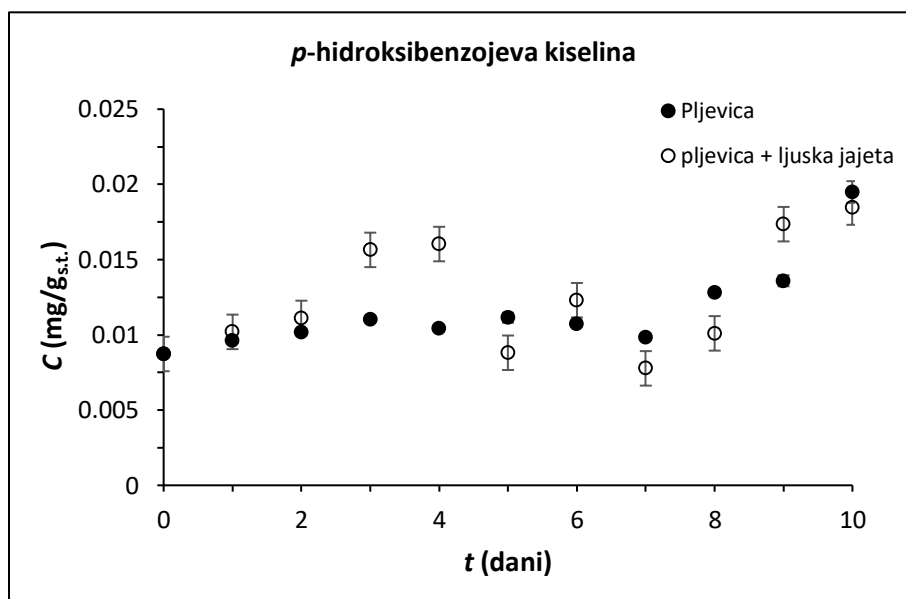
Maseni udio 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline postepeno je rastao do sedmog dana kod SSF-a bez induktora kada je dosegno maksimalnu vrijednost od 0,051 mg/g<sub>s.t.</sub>, nakon čega je maseni udio opadao (Slika 18). U pokusu s dodatkom ljuske jajeta kao induktora sinteze enzima maseni udio 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline rastao je do devetog dana SSF-a gdje je dosegno maksimalnu vrijednost od 0,031 mg/g<sub>s.t.</sub>, nakon čega je maseni udio opadao. Ukoliko se uspoređuju pokus s dodatkom induktora i bez dodatka induktora, najveći dosegnuti maseni udio 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline u pokusu bez dodatka induktora je znatno veći (za 39,22%) od najboljeg ostvarenog masenog udjela u pokusu sa samljevenom ljuskom jajeta.



Slika 18. Srednje vrijednosti masenog udjela 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (C) u ekstraktima biološki obrađene pljevice ječma u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

#### 4.4. *p*-hidroksibenzojeva kiselina

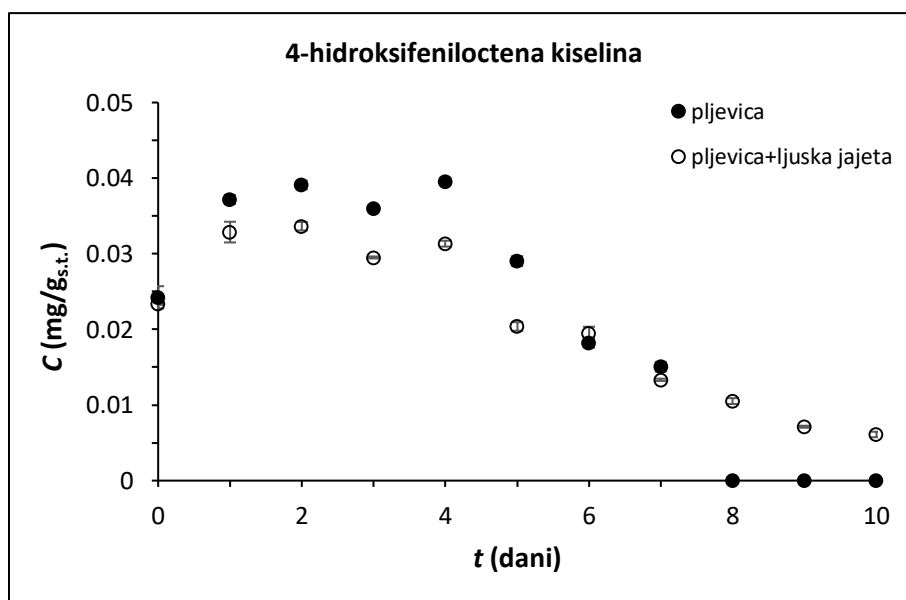
Najveći maseni udio *p*-hidroksibenzojeve kiseline dobiven je u ekstraktima pljevice ječma nakon 10 dana fermentacije u oba pokusa odnosno u pokusu bez induktora iznosio je 0,020 mg/g<sub>s.t.</sub>, a u pokusu s dodatkom induktora 0,019 mg/g<sub>s.t.</sub> (Slika 19). Na slici je vidljivo da se trend porasta prinosa *p*-hidroksibenzojeve kiseline razlikovao kod pokusa, odnosno u prva četiri dana bio je nešto veći u odsustvu induktora u odnosu na prisutstvo induktora.



Slika 19. Srednje vrijednosti masenog udjela *p*-hidroksibenzojeve kiseline (C) u ekstraktima biološki obrađene pljevice ječma u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

#### 4.5. 4-hidroksifeniloctena kiselina

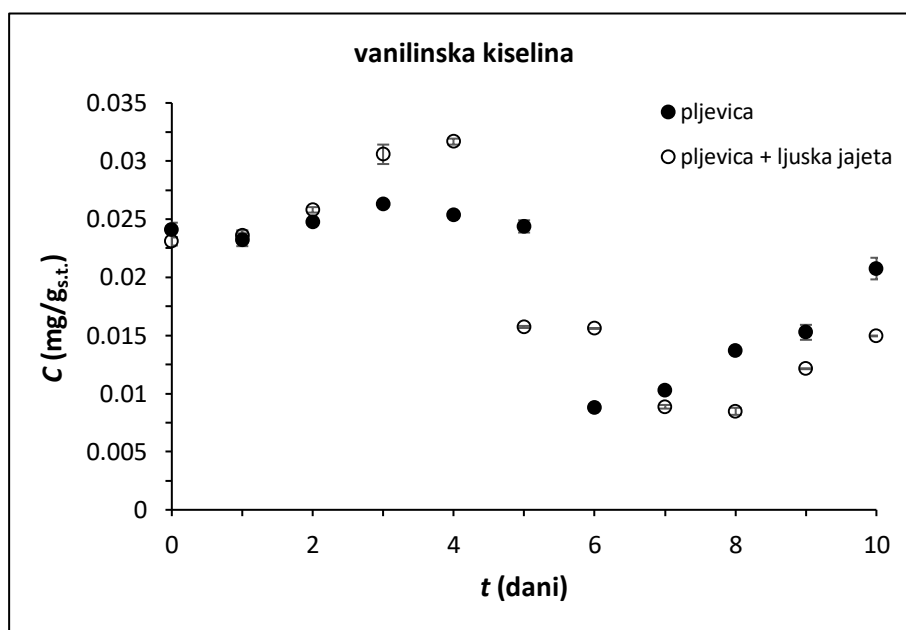
Maseni udio 4-hidroksifeniloctene kiseline u pokusu bez dodatka induktora rastao je u prvih 4 dana SSF-a gdje je postignut najveći maseni udio u iznosu od 0,040 mg/g<sub>s.t.</sub>, nakon čega je prinos naglo opadao do osmog dana, nakon čega više nije detektirana u ekstraktima pljevice (Slika 19). Kod pokusa s dodatkom induktora najveći maseni udio 4-hidroksifeniloctene kiseline bio je nakon drugog dana fermentacije i iznosio je 0,037 mg/g<sub>s.t.</sub>, nakon čega je maseni udio 4-hidroksifeniloctene kiseline opadao. Uspoređujući maseni udio dobiven u pokusu s induktorom i maseni udio dobiven bez induktora može se vidjeti, kao i na Slici 20, da je maksimalni prinos 4-hidroksifeniloctene kiseline nešto veći (za 8,11%) u pokusu bez dodatka induktora.



Slika 20. Srednje vrijednosti masenog udjela 4-hidroksifeniloctene kiseline (C) u ekstraktima biološki obrađene pljevice ječma u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

#### 4.6. Vanilinska kiselina

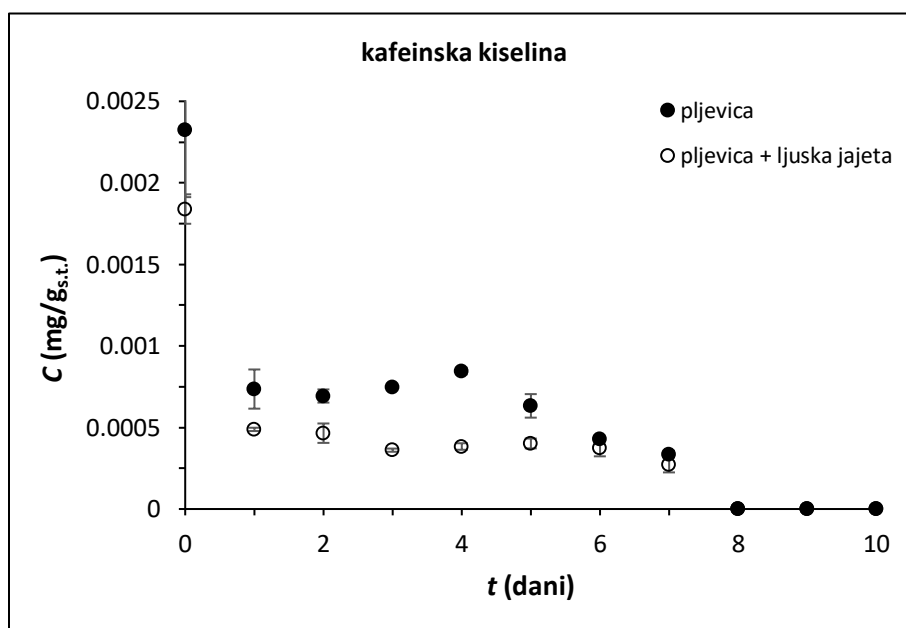
Najveći prinos vanilinske kiseline u ekstraktu pljevice bez dodatka induktora postignut je nakon 3 dana SSF-a (0,026 mg/g<sub>s.t.</sub>) nakon čega je prinos opadao do šestog dana te ponovo rastao od 6. do 10. dana SSF-a (slika 21.). U pokusu s dodatkom indikatora, prinos vanilinske kiseline povećavao se prva četiri dana SSF-a kada je ostvaren najveći prinos vanilinske kiseline od 0,032 mg/g<sub>s.t.</sub> Na osnovi određenih masenih udjela vanilinske kiseline u ekstraktima, vidljivo je da je bolja ekstraktibilnost postignuta u pokusu s dodatkom induktora i to za 18,75% ako se uspoređuju maksimalni ostvareni prinosi u oba pokusa.



Slika 21. Srednje vrijednosti masenog udjela vanilinske kiseline (C) u ekstraktima biološki obrađene pljevice ječma u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

#### 4.7. Kafeinska kiselina

Početni maseni udio kafeinske kiseline u pokusu bez induktora iznosio je 0,002 mg/g<sub>s.t.</sub>, dok je u pokusu s dodatkom ljuske jajeta iznosilo 0,0018 mg/g<sub>s.t.</sub> (Slika 22). U oba pokusa vidljivo je da je prinos kafeinske kiseline tijekom SSF-a naglo opadao i to tako da se maseni udio prepолоvio odmah nakon prvog dana fermentacije, a nakon 8. dana SSF-a nije zabilježeno njezino prisutstvo u ekstraktima.

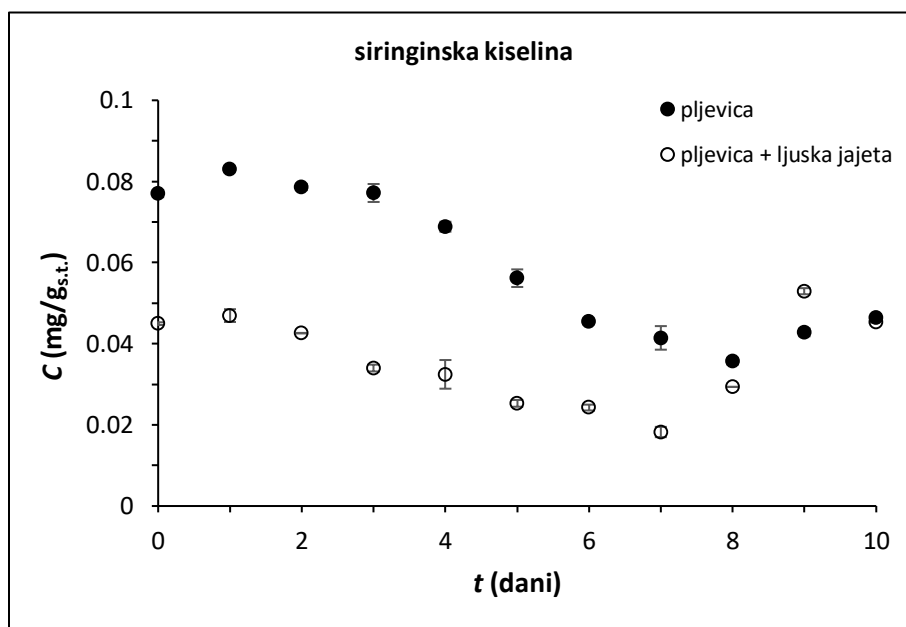


Slika 22. Srednje vrijednosti masenog udjela kafeinske kiseline (C) u ekstraktima biološki obrađene pljevice ječma u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)



#### 4.8. Siringinska kiselina

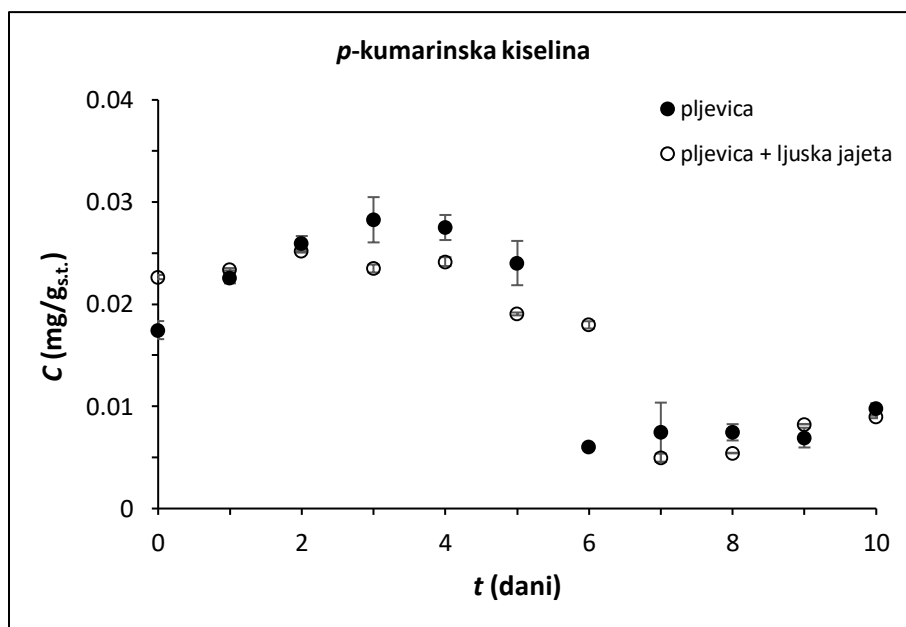
Slika 23. prikazuje trend prinosa siringinske kiseline kroz 10 dana SSF-a. Vidljivo je da su veći prinosi ostvareni u pokusu bez dodatka induktora gdje je najveći maseni udio zabilježen u ekstraktima dobivenim iz uzoraka pljevice ječma nakon biološke obrade tijekom jednog dana (0,083 mg/g<sub>s.t.</sub>) nakon čega je maseni udio opadao. U pokusu s dodatkom induktora uočen je neznatan porast prinosa nakon prvog dana fermentacije nakon čega je prinos opadao do 8 dana SSF-a kada ponovo počinje rasti dosežući najveći prinos deveti dan SSF-a (0,053 mg/g<sub>s.t.</sub>).



Slika 23. Srednje vrijednosti masenog udjela siringinske kiseline ( $C$ ) u ekstraktima biološki obrađene pljevice ječma u ovisnosti o vremenu fermentacije ( $t$ )

#### 4.9. *p*-kumarinska kiselina

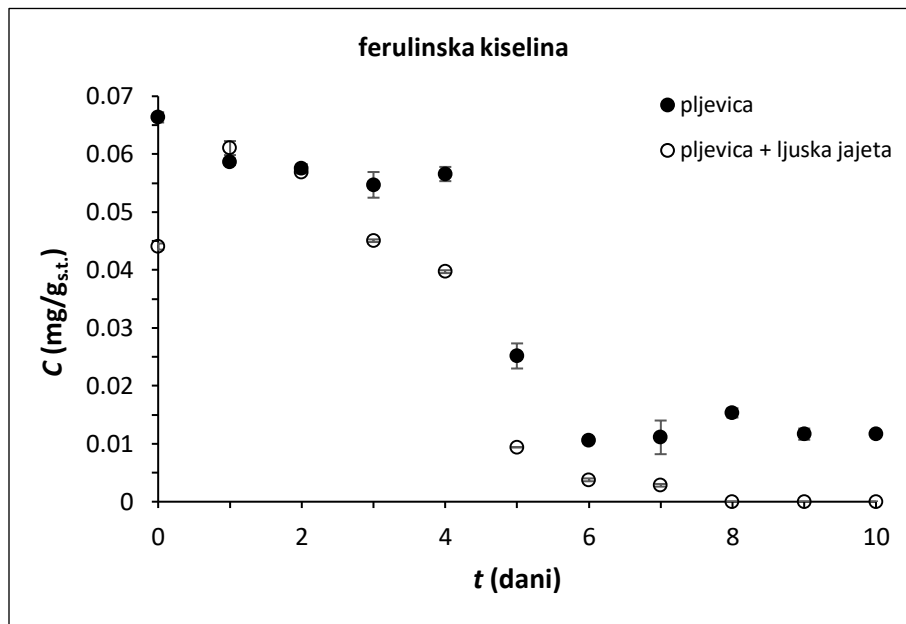
Na Slici 24. vidljivo je da je maseni udio *p*-kumarinske kiseline u početnim ekstraktima pljevice ječma bez dodatka induktora (0,018 mg/g<sub>s.t.</sub>) bio je nešto niži od masenog udjela u pokusu s dodatkom ljuske jajeta (0,023 mg/g<sub>s.t.</sub>). Najveći maseni udio *p*-kumarinske kiseline uočen je nakon trećeg dana SSF-a bez dodatka induktora (0,028 mg/g<sub>s.t.</sub>) odnosno nakon drugog dana kod pokusa s dodatkom induktora (0,025 mg/g<sub>s.t.</sub>). Pokus bez dodatka induktora rezultirao je 10,71 % većim masenim udjelom *p*-kumarinske kiseline u odnosu na pokus bez dodatka induktora ako se gledaju najbolji ostvareni maseni udjeli. Nakon petog dana fermentacije koncentracija *p*-kumarinske kiseline je opadala.



Slika 24. Srednje vrijednosti masenog udjela *p*-kumarinske kiseline (C) u ekstraktima biološki obrađene pljevice ječma u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

#### 4.10. Ferulinska kiselina

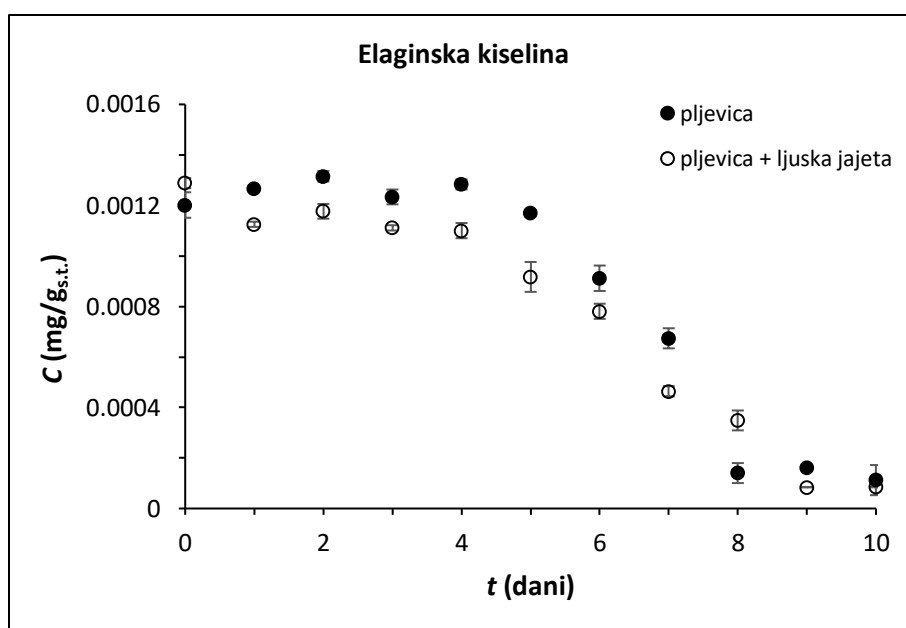
Slika 25. prikazuje trend promjene masenog udjela ferulinske kiseline s vremenom trajanja SSF-a za oba pokusa. Najveći maseni udio ferulinske kiseline u pokusu s dodatkom ljuske jajeta dobiven je nakon 1. dana fermentacije (0,061 mg/g<sub>s.t.</sub>), nakon čega se uočava trend smanjena ferulinske kiseline. U slučaju pokusa bez dodatka ferulinske kiseline najveća koncentracija ferulinske kiseline (0,066 mg/g<sub>s.t.</sub>) je određena u početnom uzorku bez biološke obrade dok je biološka obrada utjecala na smanjenje koncentracije ferulinske kiseline.



Slika 25. Srednje vrijednosti masenog udjela ferulinske kiseline ( $C$ ) u ekstraktima biološki obrađene pljevice ječma u ovisnosti o vremenu fermentacije ( $t$ )

#### 4.11. Elaginska kiselina

Maseni udio elaginske kiseline u početnom uzorku bez dodatka induktora iznosio je 0,001 mg/g<sub>s.t.</sub> dok je s dodatkom induktora udio bio nešto viši (0,0013 mg/g<sub>s.t.</sub>) (Slika 26). U prvom pokusu bez dodatka induktora vidljivo je da je najveći udio elaginske kiseline dobiven u ekstraktima dobivenim iz biološki obrađenih uzoraka nakon 2 dana SSF-a, dok je u slučaju dodatka induktora zabilježeno opadnje masenog udjela elaginske kiseline u biološki obrađenim uzorcima.

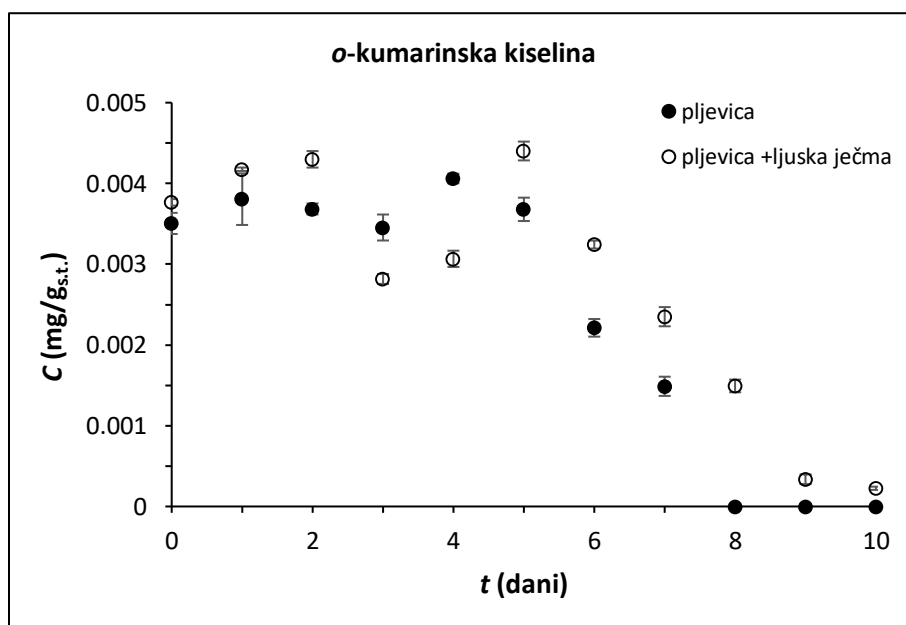


Slika 26. Srednje vrijednosti masenog udjela elaginske kiseline (C) u ekstraktima biološki obrađene pljevice ječma u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

#### 4.12. *o*-kumarinska kiselina

Maseni udio *o*-kumarinske kiseline na početku pokusa s dodatkom induktora iznosio je 0,0038 mg/g<sub>s.t.</sub>, a najveća dobivena vrijednost iznosila je 0,0044 mg/g<sub>s.t.</sub> 5. dana fermentacije. U pokusu bez dodatka induktora maseni udio je rastao do 4. dana (0,0041 mg/g<sub>s.t.</sub>) od početne vrijednosti koja je iznosila 0,0035mg/g<sub>s.t.</sub>.

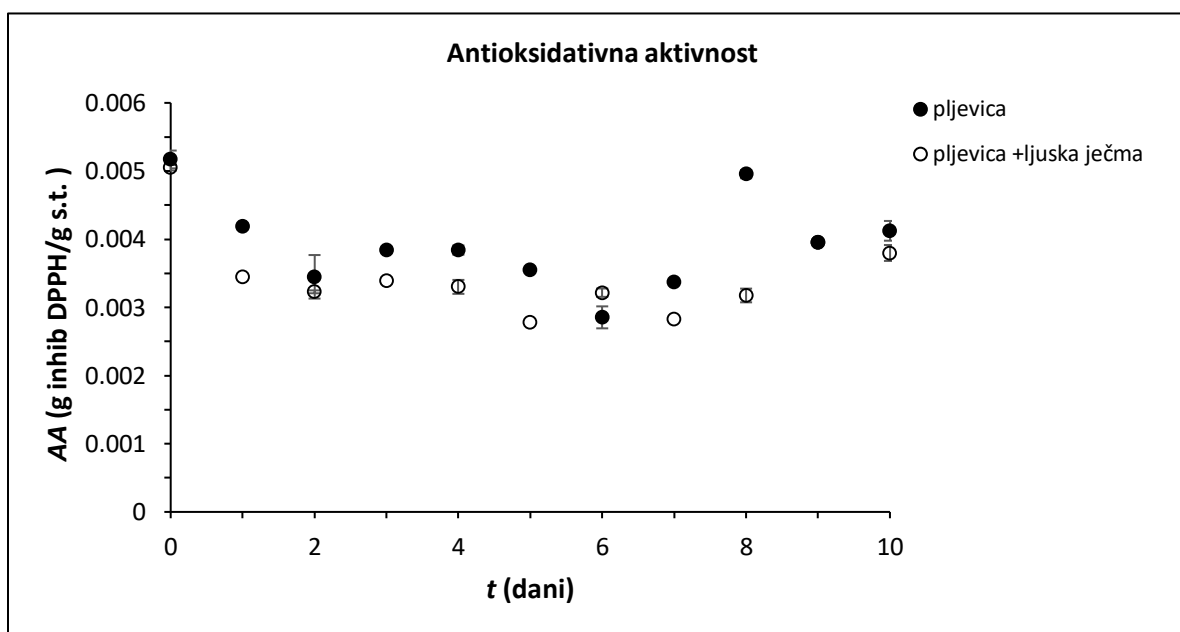
Vidljivo je iz slike 27. da dobiveni maseni udio u pokusu bez dodatka induktora raste do 4. dana fermentacije, nakon čega počinje opadati, a nakon 8. dana nije detektiran u ekstraktima. U pokusu s dodatkom ljuske jajeta maseni udio raste do 5. dana fermentacije, te postepeno opada. Pokus s dodatkom ljuske jajeta dao je nešto bolje rezultate od pokusa bez dodatka induktora.



Slika 27. Srednje vrijednosti masenog udjela *o*-kumarinske kiseline (C) u ekstraktima biološki obrađene pljevice ječma u ovisnosti o vremenu fermentacije (t)

#### 4.13. Antioksidativna aktivnost ekstrakata pljevice ječma

Ovisnost antioksidacijske aktivnosti ekstrakata pljevice ječma o vremenu trajanja biološke obrade prikazana je na Slici 28. Vidljivo je da su ekstrakti pljevice ječma dobiveni iz biološki obrađenih uzoraka bez dodataka ljuske jajeta kao induktora imali veću antioksidacijsku aktivnost, koja se očituje u većoj inhibiciji DPPH radikala, u odnosu na ekstrakte dobivene iz biološki obrađene pljevice ječma uz dodatak inhibicije. Najveća antioksidacijska aktivnost (0,005 g inhib DPPH/g s.t.) uočena je u početnim biološki neobrađenim uzorcima u oba pokusa te nakon 8. dana SSF-a u pokusu bez dodataka induktora.

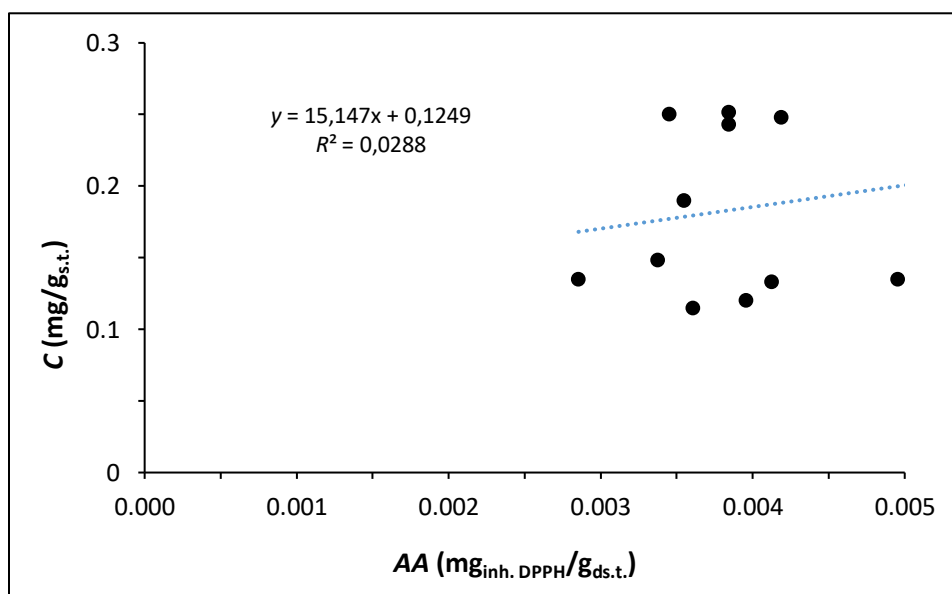


Slika 28. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata (AA) pljevice ječma u ovisnosti o vremenu ( $t$ ) fermentacije na čvrstim nosačima

#### 4.14. Korelacija udjela fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti

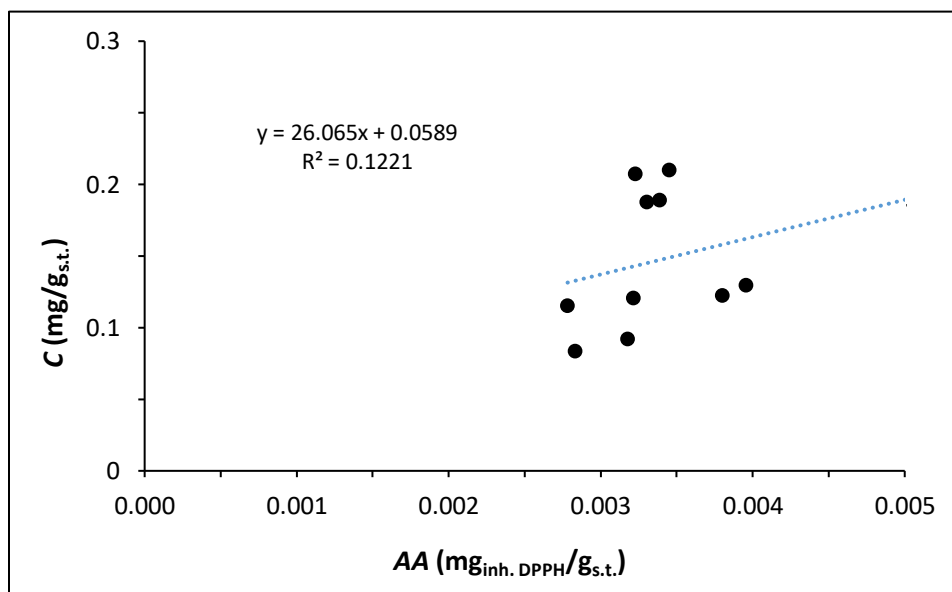
Slika 29. prikazuje korelaciju između masenog udjela ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima biološki obrađenih uzoraka pljevice ječma bez dodatka induktora i antioksidacijske aktivnosti pljevice ječma. Ukupne kiseline u ovom slučaju predstavljaju sumu masenih udjela kvantificiranih svih 10 fenolnih kiselina prikazanih u ovom radu.

Koeficijent korelacije može se kretati u rasponu  $-1 \leq R \leq 1$ . Ako je vrijednost koeficijenta korelacije  $R$  blizu nule ili jednaka nuli, to znači da je veza između varijabli  $x$  i  $y$  slaba ili ne postoji; što je vrijednost koeficijenta korelacije bliža ili jednaka 1 ili  $-1$ , to je veza između varijabli  $x$  i  $y$  jača. Vidljivo je da je za promatrani slučaj korelacija  $R = 0.17$  što predstavlja slabu pozitivnu korelaciju te sugerira da dokazane fenolne kiseline ne pridonose značajno antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakata.



Slika 29. Korelacija masenog udjela ukupnih fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti ekstrakta biološki obrađene pljevice ječma u pokusu bez dodatka ljuske jajeta

Slika 30. prikazuje korelaciju između masenog udjela ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima biološki obrađenih uzoraka pljevice ječma s dodatkom induktora i antioksidacijske aktivnosti pljevice ječma. Vidljivo je da je za promatrani slučaj korelacija ( $R = 0.35$ ) što predstavlja slabu pozitivnu korelaciju te sugerira da dokazane fenolne kiseline ne pridonose značajno antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakata.



Slika 30. Korelacija masenog udjela ukupnih fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti ekstrakta biološki obrađene pljevice ječma u pokusu s dodatkom ljuske jajeta



## **5. ZAKLJUČCI**

U ovom istraživanju provedena su dva pokusa s ciljem praćenja utjecaja biološke obrade, pomoću *Trametes versicolor*, na ekstraktibilnost fenolnih kiselina. Prvi pokus proveden je bez dodatka induktora, a drugi s dodatkom ljuske jajeta koja je služila kao induktor sinteze enzima koji mogu biti odgovorni za razgradnju lignocelulozne strukture te time pridonijeti oslobađanju fenolnih kiselina i povećati njihov prinos.

Na osnovu dobivenih eksperimentalnih podataka, njihove statističke obrade i rasprave za uvjete provedbe eksperimenata izvedeni su sljedeći zaključci:

- U oba pokusa masa supstrata opadala je svakim danom provođenja pokusa. U 10 dana provđenja pokusa, masa supstrata u pokusu bez dodatka induktora pala je za 14,74%, dok je u pokusu s dodatkom induktora pala za 11,53%.
- U ekstraktima pljevice ječma identificirano je i kvantificirano 10 fenolnih kiselina (3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, 4-hidroksifeniloctena kiselina, vanilinska kiselina, kafeinska kiselina, siringinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, elaginska kiselina i *o*-kumarinska kiselina) i generalno se može zaključiti da su veći prinosi fenolnih kiselina dokazani u ekstraktima biološki obrađenih uzoraka pljevice ječma bez dodatka induktora.
- Pokus bez dodatka induktora donio je sljedeće rezultate:
  - siringinska kiselina dokazana je u najvećoj koncentraciji pri čemu je najbolji prinos (0,083 mg/g<sub>s.t.</sub>) uočen nakon 1. dana SSF-a dok je najveći prinos ukupnih fenolnih kiselina (0,252 mg/g<sub>s.t.</sub>) dokazan nakon 3. dana SSF-a.
- U pokusu s dodatkom ljuske jajeta:
  - ferulinska kiselina dokazana je u najvećoj koncentraciji pri čemu je maksiimalan prinos (0,061 mg/g<sub>s.t.</sub>) ostvaren nakon 1. dana fermentacije, kao i maksimalan prinos ukupnih fenolnih kiselina (0,210 mg/g<sub>s.t.</sub>).
- Antioksidacijska aktivnost ekstrakata bila je najveća u početnim uzorcima bez biološke obrade u oba pokusa i iznosila je 0,005g<sub>inhib.DPPH</sub>/g<sub>s.t.</sub>.
- Utvrđena je slaba pozitivna korelacija između antioksidacijske aktivnosti i prinosa ukupnih fenolnih kiselina u oba pokusa.

## **6. LITERATURA**

- Ali H. K. Q., Zulkali M. M. D.: *Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation*. Chemical and Biochemical Engineering quarterly, vol. 25:255–266, 2011.
- Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyüren M., Esin Çelik S., Bektaşoğlu Berker K.I., Özyurt D.: *Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay*. Review. Molecules 12:1496–1547, 2007.
- Benvenuti S., Pellati F., Melegari M., Bertelli D.: *Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of Rubus, Ribes, and Aronia*. Journal of Food Science 69:164-169, 2004.
- Bravo, L. *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance*. Nutrition Review. John Wiley & Sons, Inc, New York 56:317 – 333, 1998.
- Berend S., Grabaric Z.: *Flow – injection method in determining food polyphenol*. Arh Higijena Toksikol 59:205-212, 2008.
- Bucić Kojić A.: *Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa*. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2008.
- Chalermchat Y., Fincan M., Dejmeek P.: *Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment: mathematical modelling of mass transfer*. Journal of Food Engineering 64: 229-236, 2004.
- Couto S. R., Sanroman M. A.: *Application of solid-state fermentation to food industry: a review*. Journal of Food Engineering 76:291–302, 2006.
- Dai J., Mumper R.J.: *Plant Phenolics: Extraction, Analysis and their Antioxidant Anticancer Properties*. Molecules 15:7313-7352, 2010.
- Desai S. S., Nityanand C.: *Microbial Laccases and their Applications: A Review*. Asian Journal of Biotechnology 3:98 – 124, 2011.
- Duraković S.: *Opća mikrobiologija*, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.
- Floros J. D., Rattray J., Liang H.: *Mass transfer and diffusion in foods*. U Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999.
- Gadd G M.: *Fungi in bioremediation*. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 2001.
- Han X., Shen T., Luo H.: *Dietary Polyphenols and Their Biological significance*. Review. International Journal of Molecular Sciences 8:950-988, 2007.
- Johnson J. A.: *Investigating fungi which cause rot and decay*, Tested studies for laboratory teaching, C.A. Goldman, 1990.
- Kazazić S. P.: *Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida*. Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju 55:279-290, 2004.
- Leskošek-Čukalović I.: *Tehnologija piva - slad i nesladovane sirovine*. Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2002.

- Lorenzo M., Moldes D., Couto S. R., Sanroman A.: *Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of Trametes versicolor*. Bioresource Technology 82:109 – 113, 2001.
- Macheix J.J., Fleureit A., Billot J.: *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton, Florida USA, 1990.
- Mandić M.L.: *Znanost o prehrani, interna skripta*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Mandić M.L.: *Funkcionalna hrana i prehrambeni dodaci, predavanja*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.
- Marić V., Šantek B.: *Biokemijsko inženjerstvo*. Golden Marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2009.
- Mitchell D. A., Krieger N., Berovič M.: *Solid-state fermentation bioreactors, Fundamentals of design and operation*. Springer, Berlin Heidelberg, 2006.
- Mussatto S. I., Ballesteros L. F., Martins S., Teixeira J. A.: *Use of Agro-Industrial Wastes in Solid State Fermentation Processes*. UIndustrial Waste. Intech, 2012.
- Nester E. W., Anderson D. G., Robert Evans Jr. C., Pearsall N. N., Nester M. T.: *Microbiology – A Human Perspective*. McGraw-Hill, 2004.
- Naczk M., Shahidi F.: *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41:1523-1542, 2006.
- Pandey A.: *Solid-state fermentation*. Biochemical Engineering Journal 13:81–84, Elsevier, 2003.
- Pejin D. J.: *Industrijska mikrobiologija*. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 2003.
- Pereira D.M., Valentão P, Andrade P: *Phenolics: From Chemistry to Biology*. Molecules 14:2202-2211, 2009.
- Pilaš J.: *Proizvodnja lakaze uzgojem Trametes versicolor na otpadu industrije pulpe i papira*. Diplomski rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.
- Raimbault M.: *General and microbiological aspects of solid-state fermentation*. Electronic Journal of Biotechnology, Vol. 1, No. 3, 1998.
- Revankar M. S., Lele S. S.: *Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1*. Process Biocemistry 41:581-588, 2006.
- Schuster B., Hermann K.: *Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid and derivatives in soft fruits*. Phytochemistry 24 (11):2761-2764, 1985.
- Singh H.: *Mycoremediation: fungal bioremediation*. Wiley-Interscience, New Jersey, 2006.
- Skoog D. A., West D. M., Holler J. J.: *Osnove analitičke kemije*. Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- Strack D.: *Phenolic metabolism*. U Plant biochemistry, (Dey PM, Harborne JB, ured.), str.387-416. Academic Press, London, UK, 1997.
- Stratil P., Klejdus B., Kubán V.: *Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables - Evaluation of spectrophotometric methods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54:607-616, 2006.

Šelo G.: *Utjecaj dodatka sirka na aktivnost lakaze tijekom submerznog uzgoja Trametes versicolor*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

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

Tavares A. M. P., Coelho M. A. Z., Coutinho J. A. P., Xavier A. M. R. B.: *Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modelling*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80:669 – 676, 2005.

Tišma M., Panjičko M., Zelić B., Velić N.: *Razgradnja lignoceluloznega materiala s pomočjo gliv bele trohnobe*. Ekolist, 2013.

Tišma M., Velić N., Zelić B.: *From waste to value-added products – solid-state fermentation by white-rot fungi*. U Biotechnology (Multi – Volume Set), str. 223 – 256, Studium Press LCC, New Delhi, 2014.

Toca-Herrera J. L., Osma J. F., Rodriguez Couto S.: *Potential of solid state fermentation for laccase production*. In Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Mycology, 391 – 400. Formatex, Bajadoz, Spain, 2007.

Ugarčić-Hardi Ž.: *Tehnologija prerade sirovina biljnog podrijetla, predavanja*. Prehrambenotehnološki fakultet, Osijek, 2010a.

Ugarčić-Hardi Ž.: *Sirovine biljnog podrijetla, predavanja*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010b.

Villaño D., Fernández-Pachón M.S., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C.: *Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro*. Analitica Chimica Acta 538:391- 398, 2005.

Webster J., Weber R. W. S.: *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, 2007.

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

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

<https://www.first-nature.com/fungi/trametes-versicolor.php>, 24.04.2019.