

# Razvoj procesa biološke obrade i frakcioniranja tropa grožđa u svrhu proizvodnje fenolnih spojeva

---

Šelo, Gordana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

*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:109:363848>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-05**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Gordana Šelo**

**RAZVOJ PROCESA BIOLOŠKE OBRADE I  
FRAKCIONIRANJA TROPA GROŽĐA U SVRHU  
PROIZVODNJE FENOLNIH SPOJEVA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Osijek, rujan, 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam

Zavod za procesno inženjerstvo

Katedra za mehaničke, toplinske i separacijske procese

Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

UDK: 663.26 : 582.28 (043.3)

663.26 : 547.56 (043.3)

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Znanstvena grana:** sve grane u polju Prehrambena tehnologija

**Tema rada:** prihvaćena je na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, akademske godine 2020./2021., održanoj 27. svibnja 2021.

**Voditelj:** prof. dr. sc. Mirela Planinić

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

### RAZVOJ PROCESA BIOLOŠKE OBRADJE I FRAKCIONIRANJA TROPA GROŽĐA U SVRHU PROIZVODNJE FENOLNIH SPOJEVA

Gordana Šelo, 011312930

#### Sažetak:

Trop grožđa je proizvodni ostatak vinarija koji obiluje biološki aktivnim fenolnim spojevima. U ovom istraživanju korišten je trop crnih sorti grožđa kao supstrat za uzgoj jedanaest različitih filamentoznih gljiva (*Trametes versicolor* TV6, *Trametes versicolor* TV8, *Trametes versicolor* AG613, *Trametes gibbosa*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermisporea*, *Pleurotus eryngii*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Humicola grisea* i *Rhizopus oryzae*) u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima s ciljem utvrđivanja njihovog utjecaja na ekstraktibilnost fenolnih spojeva. *Screeningom* profila fenolnih spojeva u ekstraktima dobivenim prije i nakon biološke obrade tropa grožđa identificiran je i kvantificiran ukupno 21 fenolni spoj. Utvrđeno je da je biološkom obradom uzorka frankovka pomoću *R. oryzae* ostvareno povećanje prinosa (za 1,1 – 2,4 puta u odnosu na udio u početnom biološki neobrađenom uzorku) najvećeg broja (jedanaest) ispitivanih fenolnih spojeva te su isti procesni uvjeti korišteni za uvećanje mjerila procesa u bioreaktoru s pliticama, gdje je ostvareno povećanje prinosa ispitivanih fenolnih spojeva za 1,1 – 2,5 puta u odnosu na udio u početnom biološki neobrađenom uzorku. Tijekom fermentacije mjerena je aktivnost hidrolitičkih ( $\beta$ -glukozidaza, ksilanaza, celulaza, invertaza) enzima od kojih je enzim ksilanaza imao najveću aktivnost (62,96 U/g<sub>s.t.</sub> u laboratorijskim staklenkama i 47,67 U/g<sub>s.t.</sub> u bioreaktoru s pliticama) te lignolitičkih enzima (lakaza, mangan peroksidaza, lignin peroksidaza) kod kojih su uočene relativno niske enzimске aktivnosti. Tijekom fermentacije u bioreaktoru s pliticama utvrđena je jaka pozitivna korelacija između stilbena i lignolitičkih enzima te ksilanaze ( $r > 0,7$ ). *R. oryzae* je transformirala trop grožđa pri čemu je reducirana njegova masa za 17,58 %.

**Ključne riječi:** trop grožđa, fenolne tvari, fermentacija na čvrstim nosačima, filamentozne gljive

**Rad sadrži:** 136 stranica  
56 slika  
11 tablica  
232 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

- |    |   |               |
|----|---|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. Marina Tišma                | predsjednik   |
| 2. | prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković | član          |
| 3. | prof. dr. sc. Natalija Velić              | član          |
| 4. | prof. dr. sc. Anita Pichler               | zamjena člana |
| 5. | prof. dr. sc. Daliborka Koceva Komlenić   | zamjena člana |

**Datum obrane:** 9. rujna 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te samo u elektroničkom obliku u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DOCTORAL THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Postgraduate University Study Food Technology and Nutrition

Department of Process Engineering  
Subdepartment of Mechanical, Thermal and Separation Processes

Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

UDC: 663.26 : 582.28 (043.3)

663.26 : 547.56 (043.3)

**Scientific area:** Biotehničke znanosti

**Scientific field:** Prehrambena tehnologija

**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. VIII. in academic year 2020./2021. held on May 27, 2021.

**Mentor:** Mirela Planinić, PhD, full prof.

**Co-mentor:** Ana Bucić-Kojić, PhD, full prof.

### DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL TREATMENT AND FRACTIONATION OF GRAPE POMACE FOR THE RECOVERY OF PHENOLIC COMPOUNDS

Gordana Šelo, 011312930

#### Summary:

Grape pomace is the production residue of wineries rich in bioactive phenolic compounds. In this study, grape pomace of red grape varieties was used as a substrate for the cultivation of eleven different filamentous fungi (*Trametes versicolor* TV6, *Trametes versicolor* TV8, *Trametes versicolor* AG613, *Trametes gibbosa*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pleurotus eryngii*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Humicola grisea*, and *Rhizopus oryzae*) under solid-state fermentation conditions with the aim of investigating their influence on the recovery of phenolic compounds. By screening the profile of phenolic compounds in the extracts obtained before and after biological treatment of grape pomace, a total of 21 phenolic compounds were identified and quantified. It was found that biological treatment of the frankovka sample with *R. oryzae* increased the recovery of most phenolic compounds (by 1.1 – 2.4-fold compared to the yield in the biologically untreated sample). The same process conditions were used to scale-up the process in a tray bioreactor, where a 1.1 – 2.5-fold increase in the recovery of the tested phenolic compounds was achieved compared to the yield in the biologically untreated sample. During fermentation, the activity of hydrolytic enzymes ( $\beta$ -glucosidase, xylanase, cellulase, invertase) was measured, of which the enzyme xylanase had the highest activity (62.96 U/g<sub>db</sub> in laboratory jars and 47.67 U/g<sub>db</sub> in a tray bioreactor) and the lignolytic enzymes (laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase) which had relatively low enzymatic activities. During fermentation in a tray bioreactor, a strong positive correlation was observed between stilbene and lignolytic enzymes and xylanase ( $r > 0.7$ ). *R. oryzae* transformed grape pomace and reduced its mass by 17.58 %.

**Key words:** grape pomace, phenolic compounds, solid-state fermentation, filamentous fungi

**Thesis contains:** 136 pages  
56 figures  
11 tables  
232 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Marina Tišma, PhD, full prof.                | chair person |
| 2. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, full prof. | member       |
| 3. Natalija Velić, PhD, full prof.              | member       |
| 4. Anita Pichler, PhD, full prof.               | stand-in     |
| 5. Daliborka Koceva Komlenić, PhD, full prof.   | stand-in     |

**Defense date:** September 9, 2022.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; President's office, University Library in Zagreb and only in electronic version in University Library in Osijek

*Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Mireli Planinić i komentorici prof. dr. sc. Ani Bucić-Kojić na svim savjetima, strpljenju i vodstvu tijekom izrade ovog rada.*

*Hvala prof. dr. Srećku Tomas, prof. dr. sc. Marini Tišma, prof. dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković i prof. dr. sc. Nataliji Velić na stručnim savjetima i komentarima.*

*Zahvaljujem mojim prijateljima i kolegama te svima onima koji su mi na bilo koji način pomogli i pružili podršku tijekom izrade ovog rada.*

*Najveća hvala mojim roditeljima i bratu na bezgraničnom strpljenju, razumijevanju i podršci.*



*Ovaj doktorski 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

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	4
2.1. TROP GROŽĐA .....	5
2.2. BIOAKTIVNE FENOLNE TVARI TROPA GROŽĐA .....	6
2.2.1. Fenolne kiseline.....	6
2.2.2. Flavonoidi .....	7
2.2.3. Stilbeni .....	8
2.2.4. Lignani .....	9
2.3. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH TVARI IZ TROPA GROŽĐA .....	9
2.4. FERMENTACIJA NA ČVRSTIM NOSAČIMA .....	12
2.4.1. Mikroorganizmi s primjenom u fermentaciji na čvrstim nosačima .....	14
2.4.2. Filamentozne gljive koje se primjenjuju u fermentaciji na čvrstim nosačima .....	14
2.4.3. Supstrati u fermentaciji na čvrstim nosačima .....	18
2.4.4. Trop grožđa u fermentaciji na čvrstim nosačima.....	20
2.4.5. Bioreaktori za fermentaciju na čvrstim nosačima .....	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	28
3.1. ZADATAK .....	29
3.2. MATERIJALI .....	29
3.2.1. Supstrat .....	29
3.2.2. Mikroorganizmi .....	29
3.2.3. Kemikalije .....	30
3.2.4. Uređaji .....	31
3.3. METODE .....	32
3.3.1. <i>Biološka obrada tropa grožđa .....</i>	<i>32</i>
<i>Biološka obrada tropa grožđa u laboratorijskim staklenkama .....</i>	<i>32</i>
<i>Biološka obrada tropa grožđa u bioreaktoru s pliticama .....</i>	<i>33</i>
3.3.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz tropa grožđa .....	34
<i>Konvencionalna kruto-tekuća ekstrakcija .....</i>	<i>35</i>
<i>Kruto-tekuća ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom .....</i>	<i>35</i>
3.3.3. Analiza fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima tropa grožđa .....	36
<i>Priprema ekstrakata tropa grožđa za analizu fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti .....</i>	<i>36</i>
<i>Određivanje koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa .....</i>	<i>36</i>
<i>Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa .....</i>	<i>37</i>
<i>Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima tropa grožđa .....</i>	<i>38</i>
<i>Određivanje koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima tropa grožđa .....</i>	<i>39</i>
<i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata tropa grožđa DPPH metodom .....</i>	<i>40</i>
<i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata tropa grožđa FRAP metodom .....</i>	<i>42</i>
<i>Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata tropa grožđa ABTS metodom .....</i>	<i>43</i>
3.3.4. Analiza šećera u ekstraktima tropa grožđa .....	45
<i>Priprema ekstrakata tropa grožđa za analizu šećera .....</i>	<i>45</i>
<i>Određivanje koncentracije pojedinačnih šećera u ekstraktima tropa grožđa .....</i>	<i>45</i>
<i>Određivanje koncentracije reducirajućih šećera DNS metodom .....</i>	<i>46</i>
3.3.5. Određivanje pH vrijednosti, aktivnosti enzima i koncentracije proteina u ekstraktima tropa grožđa.....	48

<i>Priprema ekstrakata tropa grožđa za mjerenje pH vrijednosti, aktivnosti enzima i koncentracije proteina</i> .....	48
<i>Mjerenje aktivnosti lakaze i mangan peroksidaze</i> .....	49
<i>Mjerenje aktivnosti lignin peroksidaze</i> .....	50
<i>Mjerenje aktivnosti <math>\beta</math>-glukozidaze</i> .....	51
<i>Mjerenje aktivnosti ksilanaze</i> .....	52
<i>Mjerenje aktivnosti celulaze</i> .....	54
<i>Mjerenje aktivnosti invertaze</i> .....	56
<i>Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom</i> .....	57
3.3.6. Analiza kemijskog sastava tropa grožđa .....	58
<i>Određivanje udjela suhe tvari u uzorcima tropa grožđa</i> .....	58
<i>Određivanje udjela pepela u uzorcima tropa grožđa</i> .....	58
<i>Određivanje udjela proteina u uzorcima tropa grožđa</i> .....	59
<i>Određivanje udjela ukupnog ugljika (TC), anorganskog ugljika (IC), ukupnog organskog ugljika (TOC) i ukupnog dušika (TN) u uzorcima tropa grožđa</i> .....	60
<i>Određivanje udjela neutralnih detergent vlakana (NDF), kiselih detergent vlakana (ADF) i kiselog detergent lignina (ADL)</i> .....	61
<i>Određivanje udjela masti u uzorcima tropa grožđa</i> .....	63
<i>Analiza minerala i nepoželjnih tvari u tropu grožđa</i> .....	63
<i>Određivanje koncentracije biomase u uzorcima tropa grožđa</i> .....	64
3.3.7. Statistička analiza .....	65
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	66
4.1. ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA KRUTO-TEKUĆE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA.....	67
4.2. SCREENING PROFILA FENOLNIH SPOJEVA U TROPU GROŽĐA PRIJE I NAKON FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA S RAZLIČITIM FILAMENTOZNIM GLJIVAMA .....	72
4.2.1. Fenolne kiseline.....	75
4.2.2. Flavan-3-oli .....	81
4.2.3. Flavonoli .....	82
4.2.4. Procijanidini .....	84
4.2.5. Stilbeni .....	85
4.3. BIOLOŠKA OBRADA TROPA GROŽĐA POMOĆU <i>P. eryngii</i> i <i>R. oryzae</i> U LABORATORIJSKIM STAKLENKAMA.....	87
4.4. BIOLOŠKA OBRADA TROPA GROŽĐA POMOĆU <i>R. oryzae</i> - UVEĆANJE MJERILA U BIOREAKTORU S PLITICAMA .....	93
4.4.1. Kemijski sastav .....	94
4.4.2. Analiza minerala i nepoželjnih tvari u tropu grožđa.....	99
4.4.3. Gubitak na masi supstrata.....	101
4.4.4. Koncentracija biomase .....	102
4.4.5. Utjecaj biološke obrade tropa grožđa pomoću <i>R. oryzae</i> na prinos ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida, ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina i antioksidacijsku aktivnost .....	104
4.4.6. Utjecaj biološke obrade pomoću <i>R. oryzae</i> na prinos pojedinačnih fenolnih tvari iz tropa grožđa .....	107
4.4.7. Korelacija između hidrolitičkih i lignolitičkih enzima i pojedinačnih fenolnih tvari iz tropa grožđa .....	110
5. ZAKLJUČCI .....	115
6. LITERATURA.....	120



## Popis oznaka, kratica i simbola

### Oznake

A	apsorbancija svjetlosti
C	maseni udio (mg/g <sub>s.t.</sub> )
C'	masena koncentracija (mg/mL)
d	promjer kivete (cm)
l	dužina optičkog puta (cm)
dA/dt	promjena apsorbancije u vremenu (1/min)
S.A.	specifična aktivnost enzima (U/mg, U/g)
t	vrijeme (s, min, d)
V.A.	volumna aktivnost enzima (U/L, U/mL)
V.A.'	volumna aktivnost enzima izražena na suhu tvar uzorka (U/g <sub>s.t.</sub> )
VE	volumen uzorka koji sadrži enzim (mL)
m	masa (mg, g, kg)
M	molekularna masa (g/mol)
w <sub>s.t.</sub>	udio suhe tvari u uzorku (%)

### Kratice

ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
ADF	kisela detergent vlakna (engl. <i>Acid Detergent Fiber</i> )
ADL	kiseli detergent lignin (engl. <i>Acid Detergent Lignin</i> )
BSA	goveđi serumski albumin (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CE	ekvivalenti katehina (engl. <i>Catechin Equivalents</i> )
CLD	kemiluminiscentni detektor (engl. <i>Chemiluminescence Detector</i> )
CS	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>
CS 2016.	trop grožđa sorte cabernet sauvignon, berba 2016.
CS 2017.	trop grožđa sorte cabernet sauvignon, berba 2017.
DMP	2,6-dimetoksifenol
DNS	3,5-dinitrosalicilna kiselina
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
ERG	ergosterol
F 2017.	trop grožđa sorte frankovka, berba 2017.
F3L	flavan-3-oli
FL	flavonoli
FRAP	engl. <i>Ferric Reducing/Antioxidant Power</i>
GAE	ekvivalenti galne kiseline (engl. <i>Gallic Acid Equivalents</i> )
GL	<i>Ganoderma lucidum</i>
GR	<i>Ganoderma resinaceum</i>
HBK	hidroksibenzojeve kiseline

HCK	hidroksicimetne kiseline
HG	<i>Humicola grisea</i>
IC	anorganski ugljik (engl. <i>Inorganic Carbon</i> )
LiP	lignin peroksidaza
M 2020.	trop grožđa sorte merlot, berba 2020.
MnP	mangan peroksidaza
NDF	neutralna detergent vlakna (engl. <i>Neutral Detergent Fiber</i> )
NDIR	nedisperzivni infracrveni detektor (engl. <i>Non-Dispersive Infrared</i> )
NPOC	nehlapljivi organski ugljik (engl. <i>Non Purgeable Organic Carbon</i> )
PAH	poliaromatski ugljikovodici
PC	<i>Phanerochaetae chrysosporium</i> CCBAS 570
PCB	poliklorirani bifenili
PCD	procijanidini
PDA	PDA detektor (engl. <i>Photo Diode Array Detector</i> )
PE	<i>Pleurotus eryngii</i>
PLC	programabilni logički kontroler (eng. <i>Programmable Logic Controller</i> )
p-NP	p-nitrofenol
p-NPG	p-nitrofenil-glukopiranozid
RID	RID detektor (engl. <i>Refractive Index Detector</i> )
RO	<i>Rhizopus oryzae</i>
ST	stilbeni
TC	ukupni ugljik (engl. <i>Total Carbon</i> )
TEAC	antioksidativni kapacitet ekvivalentan standardu troloxa (engl. <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> )
TG	<i>Trametes gibbosa</i>
TN	ukupni dušik (engl. <i>Total Nitrogen</i> )
TOC	ukupni organski ugljik (engl. <i>Total Organic Carbon</i> )
TPZT	2,4,6-tripiridil-s-triazin
TV AG613	<i>Trametes versicolor</i> CCBAS AG613
TV6	<i>Trametes versicolor</i> TV6
TV8	<i>Trametes versicolor</i> TV8
UF	ukupne fenolne tvari
UFL	ukupni flavonoidi
UFT	ukupne fenolne tvari (suma svih identificiranih pojedinačnih fenolnih tvari)
UHPLC	tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. <i>Ultra-high Performance Liquid Chromatography</i> )
UPA	ukupni ekstraktibilni proantocijanidini

## Simboli

$\varepsilon$	ekstinkcijski koeficijent (L/( $\mu$ mol cm), L/(mol cm), mL/( $\mu$ mol cm))
---------------	---

## Indeksi

E.	ekstrakt
M.	masti
s.t.	suha tvar
T.G.	trop grožđa
uz.	uzorak

## **1. UVOD**

Nakon prerade grožđa u vino oko 20 – 30 % ukupne mase grožđa zaostaje kao trop grožđa, proizvodni ostatak koji je bogat vlaknima, proteinima, mineralima, lipidima, prirodnim antioksidansima poput bioaktivnih fenolnih tvari i dr. Unatoč bogatom kemijskom sastavu, trop grožđa se još uvijek nedovoljno iskorištava (Kalli et al., 2018; Moro et al., 2021). Trop grožđa se često nepropisno odlaže u okoliš ili spaljuje bez jasne strategije gospodarenja ovim proizvodnim ostatkom, što može imati brojne nepovoljne utjecaje na okoliš poput pojave nepoželjnih mirisa, smanjenja klijavosti bilja u tlu te ekonomskih gubitaka (Bucić-Kojić et al., 2022). Dio nastalog tropa se ipak iskorištava u destilacijama za proizvodnju alkohola, dok se manji dio tropa grožđa koristi za kompostiranje ili se suši i koristi kao gnojivo ili hrana za životinje (Barbanera, 2021; Khiari i Jeguirim, 2018). U skladu s održivim razvojem i povećanom potražnjom potrošača za korištenjem prirodnih umjesto sintetičkih resursa, postoji veliki interes za ponovnom upotrebom tropa grožđa u različite svrhe, primjerice u proizvodnji gnojiva, stočne hrane, funkcionalne hrane, lijekova, kozmetike, industrijski važnih enzima, kompozitnih materijala, biopolimera, biomase za proizvodnju biogoriva, za uzgoj gljiva, te kao dodatka za poboljšanje izolacije zgrada, o čemu svjedoče objavljena znanstvena istraživanja (Brezoiu et al., 2020; Chowdhary et al., 2021; Kalli et al., 2018; Muñoz et al., 2014). Ove alternativne primjene tropa grožđa, kao i njegov tržišni potencijal, još su u razvoju, ali neki proizvodi su već dostupni na tržištu, poput praha kožice crvenog grožđa koji se koristi kao dodatak prehrani, kapsula ekstrakta sjemenki grožđa bogate oligomernim proantocijanidinima te ulja sjemenki grožđa (Dwyer et al., 2014; Morazzoni et al., 2021).

Poznato je da trop grožđa sadrži visok udio prirodnih bioaktivnih spojeva te je njihova separacija različitim tehnikama, a posebice ekstrakcijom aktualna tema istraživanja u cijelom svijetu. Ovi spojevi su sekundarni metaboliti biljaka koji uglavnom uključuju fenolne kiseline (hidroksibenzojeve kiseline i hidroksicimetne kiseline), flavonoide (katehine, flavonole, antocijanine i procijanidine) i stilbene, koji imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje (primjerice prevencija i liječenje šećerne bolesti i kardiovaskularnih bolesti te antibakterijski, antitumorski, protuupalni, antioksidativni učinak itd.) (Grgić et al., 2020; Moro et al., 2021; Teles et al., 2019). Tijekom proizvodnje vina samo oko 30 % fenolnih spojeva se ekstrahira u vino dok oko 70 % bioaktivnih fenolnih spojeva ostaje u tropu grožđa (Bucić-Kojić et al., 2020; Moro et al., 2021). Međutim, izdvajanje bioaktivnih spojeva iz tropa grožđa konvencionalnim metodama ekstrakcije nije u potpunosti moguće jer su ti spojevi često zarobljeni u polimernim staničnim strukturama te mogu biti prisutni i u netopivom, vezanom obliku konjugata sa šećerima, masnim kiselinama i aminokiselinama koje su dio stanične stijenke biljaka (Leite et al., 2019; Teles et al., 2019). Jedan od najzastupljenijih polimera koji čini biljnu staničnu stijenku je lignin, složeni amorfni heteropolimer sastavljen od fenilpropanoidnih jedinica, koji povezuje hemicelulozu i celulozu u biljnoj staničnoj stijenci (Zoghلامي i Paës, 2019). Udio lignina u tropu

grožđa kreće se od 11,6 % do 41,3 % (Manara et al., 2014; Zheng et al., 2012) te je za pretpostaviti da je u njega inkorporiran i značajni dio bioaktivnih tvari prisutnih u tropu grožđa. Kako bi se provelo frakcioniranje tropa grožđa s ciljem razgradnje lignocelulozne strukture i oslobađanja fenolnih spojeva, koji bi na taj način bili dostupniji za ekstrakciju, potrebna je prethodna obrada tropa grožđa. Predobrada lignoceluloznih materijala može se provoditi fizikalnim, kemijskim i biološkim metodama ili kombinacijom ovih metoda (Tišma et al., 2021). Fermentacija na čvrstim nosačima biološka je metoda predobrade, koja predstavlja učinkovitu tehnologiju i ekološki bioproces s potencijalnom industrijskom primjenom u proizvodnji visokovrijednih produkata u okvirima lignocelulozne biorafinerije te se pokazala učinkovitom u povećanju ekstrakcijskog prinosa prirodnih fenolnih spojeva (Šelo et al., 2021). Kao takva, fermentacija na čvrstim nosačima je usmjerena ka *zero-waste* konceptu koji podrazumijeva pet osnovnih principa (5R) - *refuse, reduce, reuse, repurpose* i *recycle*, a temelji se na ideji očuvanja prirodnih resursa i okoliša (Balwan et al., 2022). Najčešće korišteni mikroorganizmi u fermentaciji na čvrstim nosačima su filamentozne gljive, koje tijekom rasta sintetiziraju enzime uključene u razgradnju složenog lignoceluloznog materijala i oslobađanje fenolnih spojeva. Trop grožđa ima potencijal za primjenu u procesu fermentacije na čvrstim nosačima u svrhu dobivanja prirodnih fenolnih spojeva zahvaljujući svom kemijskom sastavu koji pogoduje rastu mikroorganizama (Leite et al., 2019). Iako su različite studije istraživale primjenu fermentacije na čvrstim nosačima na tropu grožđa kao supstrata s ciljem povećanja ekstraktibilnosti fenolnih spojeva (Leite et al., 2019; Teles et al., 2019, Teles et al., 2021), još uvijek nema puno detaljnih informacija o utjecaju uvjeta biološke obrade tropa grožđa na profil fenolnih spojeva.

Cilj ovoga rada bio je razviti procese fermentacije na čvrstim nosačima pomoću različitih filamentoznih gljiva u laboratorijskim staklenkama i utvrditi njihov utjecaj na prinos ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa te provesti uvećanje mjerila SSF procesa (engl. *scale up*) s odabranom filamentoznom gljivom i tropom grožđa odabrane sorte te uspostaviti kontrolirano okruženje za uspješnu provedbu procesa fermentacije (održavanje optimalne temperature i vlage).

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. TROP GROŽĐA

Trop grožđa je proizvodni ostatak vinarija koji se većinom sastoji od kožice, sjemenki, pulpe i ponekad peteljki. Vinova loza (*Vitis vinifera*) jedna je od najčešće uzgajanih kultura na svijetu s prosječnom godišnjom proizvodnjom grožđa od 74 milijuna tona u razdoblju 2010.-2022. dok je u Hrvatskoj u istom razdoblju prosječna godišnja proizvodnja grožđa 153 tisuće tona (FAOSTAT, 2022). Približno 70 – 80 % proizvedenog grožđa namijenjeno je proizvodnji vina, pri čemu 20 – 30 % mase prerađenog grožđa zaostaje kao trop grožđa (Antonić et al., 2020). Sorta grožđa, agrotehnički uvjeti uzgoja, proces vinifikacije i jačina prešanja grožđa utječu na zastupljenost pojedinih dijelova grožđa u tropu grožđa kao i na kemijski sastav tropa grožđa (Moro et al., 2021). Prema literaturi, udio sjemenki u tropu grožđa može varirati u rasponu 15 – 52 %<sub>s.t.</sub>, a udio kožice oko 65 %<sub>s.t.</sub>. Trop grožđa je lignocelulozni materijal koji sadrži 9,2 – 14,5 % celuloze, 4,0 – 10,3 % hemiceluloze i 11,6 – 42,2 % lignina. Osim toga, sadrži 7,0 – 23,5 % proteina, 2,7 – 49,1 % šećera i 4,8 – 6,7 % ukupnih polifenola (Bucić-Kojić et al., 2022).

Trenutni globalni izazovi kao što su klimatske promjene, degradacija ekosustava i sve veća potražnja za hranom, hranom za životinje i energijom zahtijevaju nove metode proizvodnje i zbrinjavanje proizvodnih ostataka. Trop grožđa nalazi primjenu u destilerijama za proizvodnju alkoholnih pića, a jedan manji dio se iskorištava kao kompost ili kao dodatak hrani za životinje, međutim najčešće se neplanski odlaže na tla u vinogradima ili se spaljuje (Barbanera, 2021; Bordiga et al., 2019; Khiari i Jeguirim, 2018). Takvo, neodgovarajuće zbrinjavanje tropa grožđa dovodi do velikih ekoloških problema kao što su zakiseljavanje tla, imobilizacija dušika u tlu, fitotoksičnost, antibakterijski utjecaj i smanjenje sadržaja kisika u tlu (Bustamante et al., 2008). Gomile tropa grožđa, koje se ne tretiraju i zbrinjavaju učinkovito, mogu privući muhe/štetočine koje šire bolesti, a perkolati koji nastaju iz ovih nusproizvoda mogu se infiltrirati u površinu, tlo i podzemne vode (Bordiga et al., 2019).

Prije otprilike 20 godina, većina alternativnih načina upotrebe tropa grožđa uključivala je fazu ekstrakcije ciljanih tvari koja je praćena različitim operacijama koncentriranja i separacija. Međutim, tijekom proteklog desetljeća predloženi su drugačiji pristupi za njegovo iskorištenje što potvrđuje i značajan porast broja objavljenih znanstvenih radova od 2013. godine s tematikom istraživanja alternativnih načina valorizacije tropa grožđa (Bordiga et al., 2019).

Velik broj istraživanja s različitih aspekata usmjeren je prema ovom proizvodnom ostatku vinarija jer je jeftina i lako dostupna sirovina koja predstavlja prirodni izvor polisaharida, proteina, vitamina, minerala, masnih kiselina, vlakana, ulja i biološki aktivnih spojeva (Bordiga et al., 2019). Unatoč bogatom kemijskom sastavu i višestrukim mogućnostima njegove



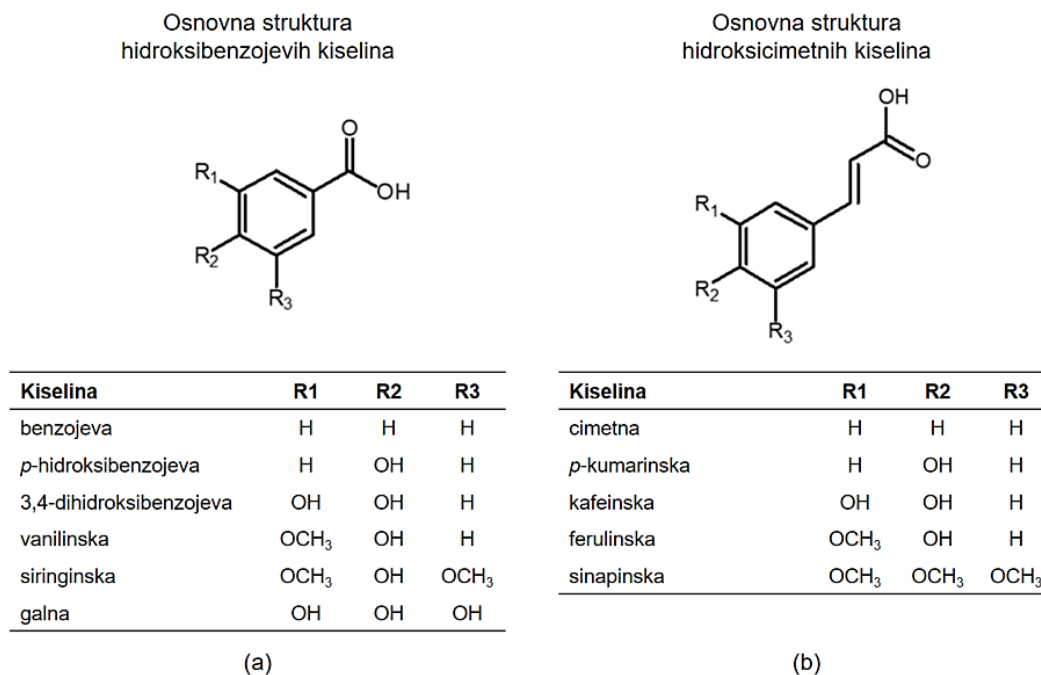
upotrebe (proizvodnja enzima, biogoriva, biognojiva, biopolimera i dr.), trop grožđa se najčešće dovodi u kontekst s fenolnim spojevima, kojima obiluje, a koji mogu imati primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Li i Row, 2021).

## 2.2. BIOAKTIVNE FENOLNE TVARI TROPA GROŽĐA

Bioaktivne fenolne tvari su najrasprostranjeniji sekundarni metaboliti biljaka čija proizvodnja uključuje biosintetski put šikiminske kiseline u biljkama tijekom njihova rasta i biosintetski put fenilpropanoide i flavonoide ili nastaju kao odgovor na stresne uvjete okoline (npr. mikrobne infekcije, ozljede ili UV zračenje). Njihova zastupljenost u biljci ovisi o vrsti biljke, uvjetima uzgoja, dozrijevanju, berbi, kao i o uvjetima prerade i skladištenja (Grgić et al., 2020; Lovrić, 2014). Uslijed njihove strukturne raznolikosti postoje brojne klasifikacije fenolnih spojeva, ali zajedničko svim skupinama je da imaju barem jedan aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. Osnovna podjela uključuje jednostavne molekule s jednim aromatskim prstenom (fenolne kiseline) i fenolne spojeve s dva ili više aromatskih prstenova (flavonoidi, lignani i stilbeni). Ostali biljni fenoli uključuju kumarine, hidrolizirajuće i kondenzirane tanine, lignine itd. Fenolni spojevi mogu postojati u biljkama u neglikoziliranom obliku (aglikoni) ili glikozidnom obliku, povezani s organskim kiselinama ili s drugim složenim molekulama kao što su tanini (Grgić et al., 2020; Kammerer et al., 2014; Kumar i Goel, 2019). Potencijalne primjene fenolnih spojeva su raznolike, ali se najčešće povezuju s pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje jer posjeduju antioksidativna, antialergijska, antihiperpigmentacijska, antitumorska, protuupalna, antimikrobna, antitrombotska, kardioprotektivna, neuroprotektivna i antidijabetička svojstva te djeluju kao zaštita protiv ubrzanog starenja, zbog kojih su predmet brojnih istraživanja (Bucić-Kojić et al., 2020; Dias et al., 2021; Drevelegka i Goula, 2020; Hoss et al., 2021; Spagnuolo et al., 2016).

### 2.2.1. Fenolne kiseline

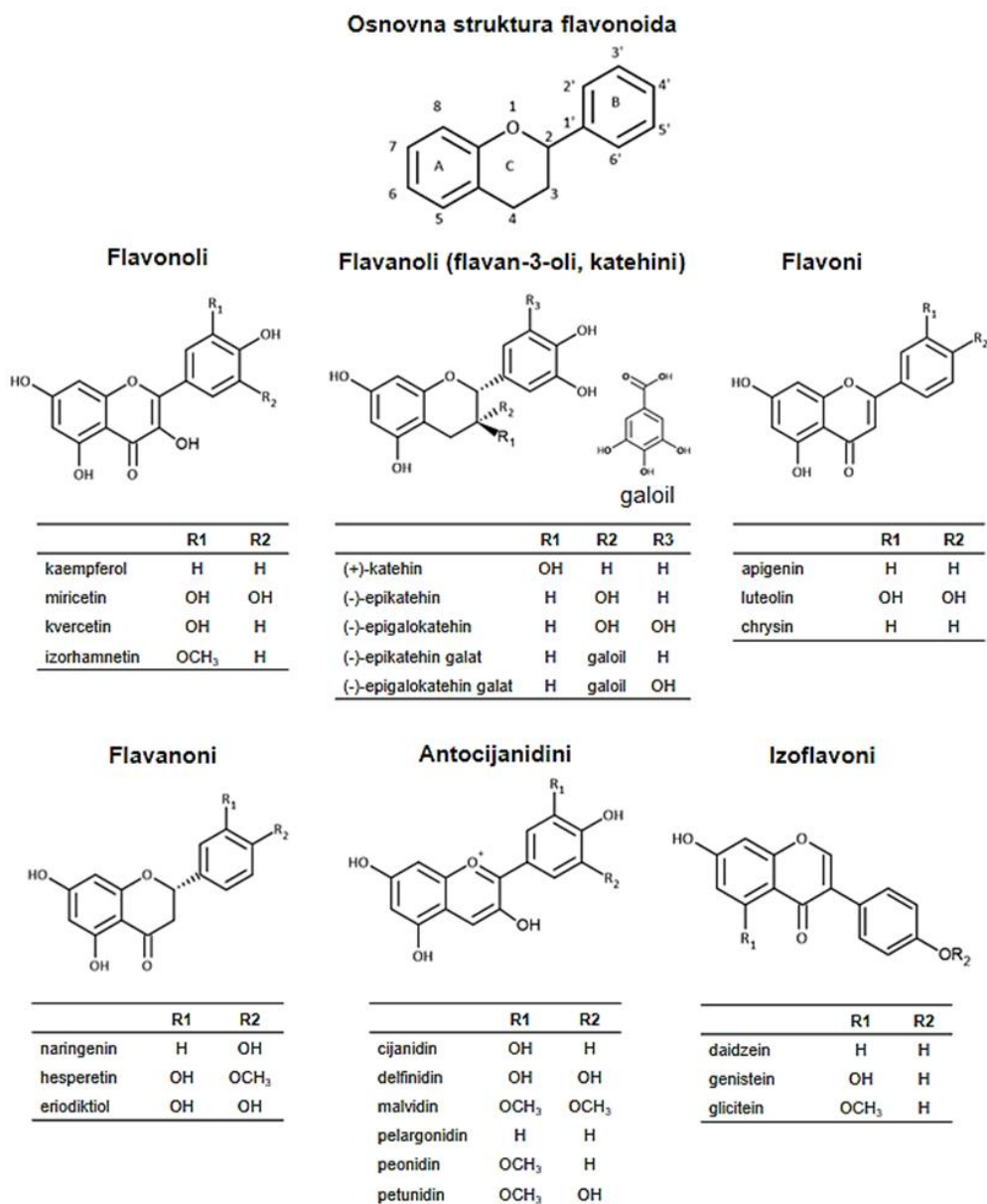
Fenolne kiseline sadrže fenolni prsten i najmanje jednu karboksilnu skupinu. Mogu se podijeliti na derivate benzojeve kiseline sa strukturom C6-C1 (galna, *p*-hidroksibenzojeva, 3,4-dihidroksibenzojeva, vanilinska, siringinska, benzojeva kiselina) i derivate cimetine kiseline sa strukturom C6-C3 (cimetna, *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska, sinapinska kiselina) (**Slika 2.1.**). Pojavljuju se u biljkama kao esteri ili glikozidi konjugirani s drugim prirodnim spojevima ili u manjoj mjeri u obliku slobodne kiseline (Goleniowski et al., 2013; Grgić et al., 2020).



**Slika 2.1.** Kemijska struktura fenolnih kiselina: (a) derivati hidroksibenzojeve kiseline; (b) derivati hidroksicimetne kiseline (Goleniowski et al., 2013; Grgić et al., 2020)

## 2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi čine najveću i najzastupljeniju skupinu fenolnih spojeva u biljkama. Osnovna struktura flavonoida temelji se na 15 atoma ugljika (C6-C3-C6) raspoređenih u dva benzenska prstena A i B povezana s heterocikličnim piranskim prstenom C (Šarić Mustapić, 2020). Položaj različitih supstituenata (hidroksilnih, metoksi i glikozidnih grupa) na prstenovima A, B i C, položaj vezanja prstenova B i C te stupanj nezasićenosti i stupanj oksidacije u strukturi prstena C odgovorni su za njihovu strukturnu raznolikost i višestruku biološku aktivnost (Heim et al., 2002). Dijetalni flavonoidi (flavonoidi koji potječu iz namirnica biljnog podrijetla) se mogu podijeliti u šest skupina (**Slika 2.2.**) na temelju oksidacije heterocikličkog prstena, a to su flavoni (apigenin, luteolin, itd.), flavanoni (naringenin, hesperetin, eriodiktiol), flavonoli (kvercetin, kempferol, miricetin, itd.), flavanoli (katehin, epikatehin, epikatehin galat, itd.), antocijanidini (cijanidin, delphinidin, malvidin, peonidin, itd.) i izoflavoni (genistein, daidzein, itd.) (El Gharras, 2009; Yilmaz i Toledo, 2004). Flavonoidi se u biljkama mogu naći u obliku glikozida, aglikona i metiliranih derivata dok su glikozilirani flavonoidi najzastupljeniji. Povezivanje šećerne komponente s aglikonom najčešće se ostvaruje preko kisikova atoma iz hidroksilne skupine (O-glikozidi), ali moguće je i vezanje šećera preko ugljikova atoma (C-glikozidi) (Dias et al., 2021; Šarić Mustapić, 2020).



**Slika 2.2.** Kemijske strukture flavonoida (Dias et al., 2021; Grgić et al., 2020; Heim et al., 2002)

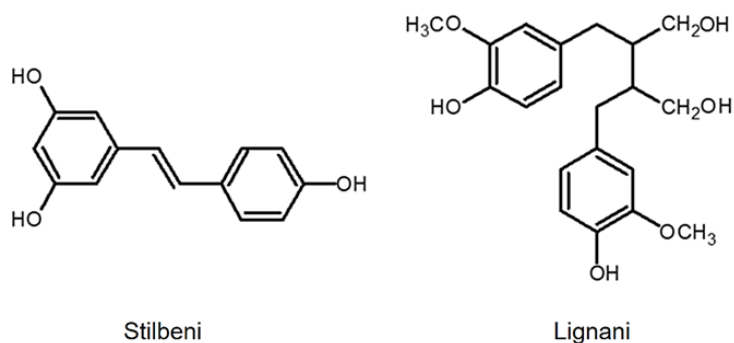
### 2.2.3. Stilbeni

Struktura stilbena temelji se na okosnici C6-C2-C6 koja se sastoji od dva aromatska prstena povezana etilenskim mostom (**Slika 2.3.**) (Grgić et al., 2020). Stilbeni nastaju iz fenilpropanoidnih spojeva, a grožđe i crno vino neki su od najvažnijih izvora stilbena u ljudskoj prehrani (Šelo et al., 2022). Jedan od najistraživanijih stilbena je resveratrol, čiji dimeri također posjeduju različitu biološku aktivnost. Primjerice  $\epsilon$ -viniferin ima važnu ulogu u inhibiciji i

progresiji raka, dok se za pallidol navodi da ima snažniju antioksidativnu aktivnost od samog resveratrola (Grgić et al., 2020; Xue et al., 2014).

### 2.2.4. Lignani

Lignani su sekundarni metaboliti vaskularnih biljnih vrsta, široko rasprostranjeni u biljnom carstvu, kojima se pripisuje širok raspon fizioloških funkcija koje pozitivno utječu na zdravlje ljudi. Pripadaju skupini difenolnih spojeva dobivenih kombinacijom dviju fenilpropanoidnih C6–C3 jedinica na  $\beta$  i  $\beta'$  ugljiku, a mogu se povezati s dodatnim eterskim, laktonskim ili ugljikovim vezama. Imaju kemijsku strukturu poput 1,4-diarilbutana (**Slika 2.3.**) (Durazzo et al., 2018). Lignin i lignani potječu od istih građevnih blokova, monolignola, ali imaju vrlo različite funkcije. Lignin jača tkiva biljke, dok lignani sudjeluju u obrani biljaka i regulaciji rasta (Behr et al., 2018). Sjemenke lana, orašasti plodovi, žitarice, povrće, čaj, kava i vino su bogat izvor lignana (Grgić et al., 2020).



**Slika 2.3.** Kemijska struktura stilbena i lignana (Almagro et al., 2013; Durazzo et al., 2018; Grgić et al., 2020)

## 2.3. EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH TVARI IZ TROPA GROŽĐA

Kvalitativni i kvantitativni sastav fenolima bogatih ekstrakata tropa grožđa ne ovisi samo o sorti grožđa, agroklimatskim uvjetima proizvodnog područja i pojedinim dijelovima grožđa zastupljenim u tropu grožđa (stabljike, sjemenke, kožica, itd.), nego ovisi i o fizikalno-kemijskim uvjetima industrijskog procesa proizvodnje vina, kombinaciji korištenih otapala i primijenjenih postupaka ekstrakcije. Dodatni čimbenici kao što su kvaliteta biljnog materijala, uvjeti skladištenja i njegova predobrada također značajno utječu na profil fenolnih spojeva u ekstraktima što posljedično ima utjecaj i na njihovu potencijalnu biološku aktivnost i daljnju primjenu. Stoga, sve ove parametre treba uzeti u obzir kako bi se dobili visokokvalitetni ekstrakti prikladni za upotrebu u prehrambenoj, kozmetičkoj i/ili farmaceutskoj industriji (Teixeira et al., 2014).

Procesni uvjeti ekstrakcije kao što su vrijeme, koncentracija otapala, omjer uzorka i otapala, veličina čestica, temperatura itd. moraju se optimizirati kako bi se postigao maksimalan prinos biološki aktivnih fenolnih spojeva. Zbog strukturne raznolikosti fenolnih spojeva, ne postoji standardizirana metoda za njihovu izolaciju, ali poželjna je primjena ekološki prihvatljivih metoda. Najčešće korištena metoda za pripremu ekstrakata tropa grožđa je konvencionalna kruto-tekuća ekstrakcija pomoću odgovarajućeg otapala (etanol, metanol, aceton, njihova mješavina s vodom i sl.) koje ekstrahira ciljane lako topive polifenole (Bucić-Kojić et al., 2022; Teixeira et al., 2014).

Kruto-tekuća ekstrakcija je separacijski proces kojim se iz čvrstog materijala izdvaja jedna ili više komponenti pomoću odgovarajućeg otapala. Ukoliko se kruto-tekuća ekstrakcija provodi pomoću otapala koje nije lako hlapivo, često se naziva i izluživanje. Izdvajanje komponenti provodi se u nekoliko koraka (Bucić-Kojić, 2008; Chanioti et al., 2014), kako slijedi:

1. difuzija otapala kroz pore krute tvari
2. otapanje komponenti
3. transport otapala s otopljenom tvari na površinu krute tvari
4. transport otopljene tvari s vanjske površine krute tvari u glavnu masu otopine
5. razdvajanje ekstrakta i krutog ostatka.

S obzirom na brojne parametre koji se moraju optimizirati kako bi ekstrakcija bila što učinkovitija te ovisno o komponentama koje se žele ekstrahirati, ne postoji samo jedan optimalan način ili postupak ekstrakcije za sve tipove uzoraka. Zbog toga se svaka primijenjena tehnika ekstrakcije treba zasebno optimizirati u smislu optimiranja parametara koji imaju najveći utjecaj na ekstrakciju ciljane komponente vodeći računa o svojstvima materijala iz kojeg se vrši ekstrakcija.

Jedan od najvažnijih koraka za učinkovitu provedbu ekstrakcije je odabir otapala. Otapalo treba biti selektivno prema komponenti koja se ekstrahira, a topljivost komponenti ovisi o odabranom otapalu, stupnju polimerizacije, interakcijama s ostalim spojevima zastupljenim u biljnom materijalu i o stvaranju netopljivih kompleksa (Bucić-Kojić, 2008; Moure et al., 2001). Prinos ekstrakcije i antioksidativna aktivnost ekstrakata snažno ovise o otapalu zbog razlike u antioksidacijskom potencijalu komponenti različitog polariteta (Mikucka et al., 2022; Moure et al., 2001; Teixeira et al., 2014). Prema literaturi, za kruto-tekuću ekstrakciju fenolnih tvari iz proizvodnih ostataka vinarija kao otapala najčešće se koriste vodeno-alkoholne otopine, metanol, etanol, propanol, aceton, etil acetat i dr. (Bucić-Kojić, 2008; Teixeira et al., 2014). Metanol je otapalo koje daje visoke prinose ciljanih fenolnih spojeva, primjerice flavan-3-ola (katehina, epikatehina i epigalokatehina), dok su se vodene otopine metanola pokazale učinkovitim otapalima u ekstrakciji derivata hidroksicimene kiseline, flavona, flavonola i

flavanola. Međutim, toksičnost povezana s ovim otapalom ograničava njegovu upotrebu samo u analitičke svrhe (Bucić-Kojić, 2008; Teixeira et al., 2014). Za razliku od metanola, etanol je ekološki prihvatljivije otapalo koje je priznato kao sigurno organsko otapalo od strane Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA, 2011) i Stručnog odbora FAO/WHO za prehrambene aditive (WHO, 2007).

Temperatura i vrijeme ekstrakcije su također faktori o kojima značajno ovisi efikasnost ekstrakcije, jer ovi parametri utječu na topljivost, brzinu prijenosa mase (koeficijent difuzije) i stabilnost fenolnih spojeva (Casazza et al., 2012). Povećanjem temperature povećava se topljivost fenolnih spojeva koji se ekstrahiraju kao i koeficijent difuzije. Prema literaturi konvencionalna kruto-tekuća ekstrakcija fenolnih spojeva iz tropa grožđa najčešće se provodi u temperaturnom rasponu 32 – 80 °C, dok vrijeme ekstrakcije može varirati od 5 minuta do 48 sati (Bucić-Kojić et al., 2007, 2013, 2020; Rajha et al., 2013; Teles et al., 2021; Tournour et al., 2015). Kada se govori o povećanju temperature ekstrakcije treba uzeti u obzir kemijsku strukturu i svojstva tvari koje se ekstrahiraju, jer previsoke temperature mogu dovesti do njihove degradacije (Teixeira et al., 2014).

Važan korak prije provedbe ekstrakcije je priprema materijala koja uključuje različite postupke poput sušenja, smrzavanja, liofilizacije, usitnjavanja i sl. Usitnjavanje materijala povećava površinu kontakta s otapalom te skraćuje put difuzije kroz krutu tvar, čime je i intenzivniji prijenos tvari. Međutim, materijal je potrebno usitniti do određene veličine čestica jer ukoliko se previše usitni moguće je stvaranje čepova zbog aglomeracije između većih čestica u sloju, što može otežati difuziju otapala (Bucić-Kojić, 2008; Gil-Martín et al., 2022). Najčešće se materijal usitnjava na veličinu čestica od 0,8 mm do 1,5 mm (Bucić-Kojić et al., 2020; Casazza et al., 2012; Gurgenidze et al., 2022; Šelo et al., 2022).

Osim konvencionalne kruto-tekuće ekstrakcije sve više se primjenjuju nekonvencionalne metode ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *Ultrasound-Assisted Extraction*, UAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *Microwave-Assisted Extraction*, MAE), ekstrakcija superkričnim fluidima (*Supercritical Fluid Extraction*, SFE), kruto-fazna ekstrakcija (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE), ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom (engl. *High Hydrostatic Pressure Extraction*, HHPE) i dr. Ove metode mogu imati određene prednosti u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju bioaktivnih tvari kao što su manja potrošnja otapala, kraće vrijeme ekstrakcije, veći prinos ekstrakcije, poboljšana kvaliteta ekstrakata u smislu postizanja određenog profila bioaktivnih spojeva (Alara et al., 2021; Caldas et al., 2018; Teixeira et al., 2014; Zia et al., 2022).

U pogledu fenolnih spojeva, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom jedna je od najčešće korištenih alternativnih metoda konvencionalnoj kruto-tekućoj ekstrakciji bioaktivnih tvari iz biljnog materijala.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) smatra se zelenom tehnikom ekstrakcije koja se koristi za učinkovitu ekstrakciju organskih kiselina, antioksidansa, pigmenata i anorganskih spojeva iz različitih vrsta uzoraka. Primjenom ove metode ekstrakcije moguće je postići učinkovitu ekstrakciju spojeva u vrlo kratkom vremenu, s manjim volumenom otapala, uz pojednostavljenu pripremu materijala, veliki prinos i manji utrošak energije u usporedbi s konvencionalnom metodom ekstrakcije (Teixeira et al., 2014; Zia et al., 2022). Efekti akustične kavitacije i mikro-strujanja ultrazvučnih valova su odgovorni za ekstrakciju željenih aktivnih spojeva. Kada se ultrazvučni valovi velike snage šire kroz matriks materijala, inducira se slijed kompresija i razrjeđivanja uzrokujući promjenu tlaka u matriksu materijala. Ova promjena tlaka dovodi do stvaranja kavitacijskih mjehurića iz plinske jezgre materijala, koji rastu sve dok ne postanu nestabilni i kolabiraju. Stvaranje, širenje i implozivni kolaps mjehurića u materijalu poznato je kao fenomen akustične kavitacije. Implozija mjehurića stvara visoki tlak i temperaturu te rezultira turbulencijom i snažnim efektima mikrostrujanja što uzrokuje razaranje stanične stijenke i dolazi do prodiranja otapala u matriks materijala (Alara et al., 2021; Zia et al., 2022). Nakon toga slijede mehanički učinci, smanjenje veličine čestica, daljnji prodor otapala te povećanje površine kontakta između tekuće i krute faze što uzrokuje otpuštanje ekstraktibilnih spojeva iz materijala (Caldas et al., 2018; Xie et al., 2015; Zia et al., 2022). Kao rezultat toga, ciljani ekstraktibilni spojevi brzo difundiraju iz materijala u otapalo odnosno povećava se prijenos kroz membranu (Teixeira et al., 2014; Zia et al., 2022). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ima i svoje nedostatke poput visokih troškova, zahtijeva optimizaciju te ponekad djelovanje ultrazvuka može uzrokovati neželjene promjene u molekulama (Mehta et al., 2022).

## 2.4. FERMENTACIJA NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Fermentacija na čvrstim nosačima (engl. *Solid-State Fermentation*, SSF) je proces u kojem mikroorganizmi rastu na vlažnom, čvrstom materijalu u kontroliranim uvjetima, bez prisutnosti slobodne vode ili s minimalnom količinom slobodne vode (Rodríguez Couto et al., 2006). Iako submerzna fermentacija (engl. *Submerged Fermentation*, SmF), koja podrazumijeva uzgoj mikroorganizama u tekućoj hranjivoj podlozi, još uvijek prevladava u biotehnološkoj industriji, prednosti SSF-a su veći prinos proizvoda, jednostavnost provedbe procesa, ekonomičnija i bolja aeracija, veća otpornost na kontaminaciju, manja potrošnja energije, uvjeti uzgoja slični uvjetima prirodnih staništa mikroorganizama, mogućnost iskorištenja biomase zaostale nakon

fermentacije itd. (Kumar et al., 2021; Liu et al., 2018; Rodríguez-Couto, 2018; Slaný et al., 2020).

Odabir supstrata i mikroorganizma, veličina čestica supstrata, koncentracija inokuluma, pH, udio vlage i aktivitet vode, temperatura i aeracija važni su parametri koji utječu na učinkovitost SSF procesa. Prije pokretanja SSF procesa važan korak je sterilizacija, kako bi se izbjegla kontaminacija te osigurali uvjeti za rast željenog radnog mikroorganizma. Veličina čestica supstrata utječe na dostupnost hranjivih tvari i prijenos kisika unutar supstrata te je ona ključni čimbenik za učinkovit prijenos topline i tvari tijekom procesa (Kumar et al., 2021; Mitchell et al., 2006a). Manje čestice supstrata osiguravaju veću površinu za rast mikroorganizma, međutim vrlo male čestice supstrata imaju tendenciju aglomeracije što može otežati prozračivanje supstrata odnosno mikrobno disanje te rezultirati slabijim rastom mikroorganizama. Veće čestice supstrata osiguravaju bolje prozračivanje zbog većeg međustaničnog prostora, ali osiguravaju ograničenu površinu za rast mikroorganizma (Pandey et al., 2008). Inokulacija supstrata u SSF procesima obično se provodi s micelijem kulture ili pripremljenom suspenzijom spora (Kumar et al., 2021; Patel et al., 2009). Koncentracija inokuluma ima značajnu ulogu u proizvodnji enzima tijekom SSF-a. Preniska koncentracija inokuluma može biti nedovoljna za pokretanje rasta kulture, dok previsoka koncentracija može uzrokovati kompetitivnu inhibiciju proizvodnje enzima zbog brzog trošenja hranjivih tvari, što rezultira smanjenjem metaboličke aktivnosti, stoga je potrebno optimirati koncentraciju dodanog inokuluma (Patel et al., 2009). Primjerice, za solubilizaciju odnosno otpuštanje fosfata iz supstrata (narančina kora uz dodatak 5 % kamenog fosfata) pomoću organskih kiselina proizvedenih u SSF uvjetima s *A. awamori*, optimalna koncentracija inokuluma bila je 20 % v/w (Gaiind, 2017), a za proizvodnju lakaze gdje je inokulacija pšenične slame provedena s različitim brojem micelijskih diskova bazidiomicete *P. ostreatus*, optimalnom se pokazala količina inokuluma od 5 micelijskih diskova na masu supstrata od 5 g (Patel et al., 2009). U SSF procesima pH je vrlo važan parametar koji utječe na rast i metabolizam mikroorganizama, međutim zbog heterogenosti supstrata i odvijanja procesa bez prisutnosti slobodne vode teško je pratiti promjene pH tijekom procesa. Ponekad se koriste amonijeve soli u kombinaciji s ureom ili nitratnim solima kako bi se neutralizirao učinak zakiseljavanja i alkalizacije (Kumar et al., 2021). Udio vlage i temperatura su također važni parametar koji utječu na cijeli proces fermentacije. Ukoliko je udio vlage previsok, prostori među česticama supstrata biti će ispunjeni vodom, a prijenos kisika će biti ograničen. S druge strane, ukoliko je udio vlage prenizak manja je topljivost hranjivih tvari te će biti oslabljen rast mikroorganizma (Kumar et al., 2021; Šelo et al., 2021). Optimalni udio vlage za rast filamentoznih gljiva i proizvodnju sekundarnih metabolita u SSF procesima varira između 55 % i 80 %, ovisno o supstratu i primijenjenom mikroorganizmu (Hamdan i Jasim, 2021; Patel et al., 2009; Pourkhanali et al.,



2021). Aeracija ili prozračivanje u SSF procesu utječe na koncentraciju kisika ( $O_2$ ) i ugljičnog dioksida ( $CO_2$ ) unutar bioreaktora, regulira uklanjanje  $CO_2$  i hlapljivih spojeva, relativnu vlažnost i poboljšava prijenos topline (Giovannozzi Sermanni i Tiso, 2007). Filamentozne gljive mogu rasti u širokom rasponu temperatura, a optimalna temperatura za rast gljive može se razlikovati od optimalne temperature za proizvodnju ciljanog produkta. Iz tog razloga je poželjno provesti optimizaciju SSF procesa s ciljem određivanja optimalne temperature (Hamdan i Jasim, 2021).

#### **2.4.1. Mikroorganizmi s primjenom u fermentaciji na čvrstim nosačima**

Mikroorganizmi koji imaju primjenu u SSF-u su gljive, kvasci i bakterije. Jednostanični organizmi poput bakterija i kvasaca rastu unutar tankog vodenog filma na površini čestica čvrstog supstrata tvoreći biofilm, dok višestanični organizmi poput filamentoznih gljiva rastu u obliku micelija koji se sastoji od isprepletenih hifa (Mitchell i Krieger, 2019). Izbor mikroorganizma u SSF-u ovisi o željenom krajnjem produktu, a izbor supstrata važan je parametar za uspješan rast odabranog mikroorganizma (Srivastava et al., 2019). Mikroorganizmi se mogu koristiti kao pojedinačne kulture, kao miješane kulture koje se mogu identificirati ili kao konzorcij miješanih autohtonih mikroorganizama. Na rast mikroorganizama tijekom biološke obrade utječu brojni čimbenici kao što su udio vlage, svojstva supstrata (kemijski sastav, veličina čestica, visina sloja supstrata), temperatura, prozračivanje, miješanje, koncentracija spora i starost kulture (López-Pérez i Viniegra-González, 2016; Srivastava et al., 2019). Bakterije se uglavnom koriste za proizvodnju enzima (proteaze, amilaze, ksilanaze, lipaze itd.) (Qureshi et al., 2016), a kvasci za proizvodnju klorogenske kiseline, etanola, aromatskih spojeva itd. (Martínez et al., 2017; Santos da Silveira et al., 2019). Zbog svojih fizioloških, biokemijskih i enzimskih svojstava, u SSF-u se najčešće koriste filamentozne gljive, osobito one koje pripadaju skupinama bazidiomiceta, askomiceta i zigomiceta (Behera et al., 2019; Ferreira et al., 2013; Londoño-Hernández et al., 2017; Steudler et al., 2019).

#### **2.4.2. Filamentozne gljive koje se primjenjuju u fermentaciji na čvrstim nosačima**

Filamentozne gljive čine veliku skupinu unutar carstva gljiva te predstavljaju najraznovrsniju skupinu mikroorganizama koji stvaraju filamentozne strukture. Zbog rasta u obliku micelija koji se sastoji od isprepletenih hifa rastu na površini supstrata te prodiru unutar materijala. Imaju

sposobnost rasta na različitim supstratima, a SSF proces oponaša uvjete rasta ovih mikroorganizama u prirodi (Karimi et al., 2018; Mitchell i Krieger, 2019).

Transformacija lignoceluloznih supstrata u svrhu proizvodnje različitih proizvoda s dodanom vrijednošću, biogoriva ili stočne hrane, pretvorbe lignocelulozne biomase u fermentabilne šećere, šećerne kiseline i/ili fenolne spojeve rezultat je kompleksnog enzimatskog sustava radnog mikroorganizma (Saroj et al., 2018). Enzimi poput pektinaze, celulaze, tanaze,  $\beta$ -glukozidaze, ksilanaze i dr. (Pinheiro et al., 2020; Teles et al., 2019), koje neke filamentozne gljive sintetiziraju tijekom SSF procesa, mogu katalizirati razgradnju polimerne strukture lignocelulozne biomase te na taj način osloboditi fenolne spojeve iz složene strukture lignina, čineći ih tada lakše dostupnima za ekstrakciju (Bucić-Kojić et al., 2017). Brojne studije se u posljednje vrijeme bave istraživanjem povećanja prinosa fenolnih spojeva biološkom obradom supstrata kao što su trop grožđa, ostaci nakon proizvodnje pekmeza od smokava, zrno prosa, komina masline, pivski trop i dr. u uvjetima SSF-a (Buenrostro-Figueroa et al., 2017; Leite et al., 2019; Salar et al., 2016; Šelo et al., 2022; Teles et al., 2021; Tišma et al., 2018). Vrsta (oksidoreduktaze, hidrolaze) i koncentracija enzima koje izlučuju filamentozne gljive ovisi o vrsti gljiva i o uvjetima uzgoja (Karimi et al., 2018). Oksidoreduktaze su odgovorne za razgradnju lignina, a uključuju oksidaze (lakaze) i peroksidaze (mangan peroksidaze, lignin peroksidaze, versatil peroksidaze) (Šelo et al., 2021; Tišma et al., 2021). Hidrolaze uključuju celulaze (endoglukanaze, egzoglukanaze, celobiohidrolaze,  $\beta$ -glukozidaze), ksilanaze ( $\beta$ -mananaze, arabinofuranozidaze,  $\beta$ -ksilozidaze) (Alarcón et al., 2021; Amaro-Reyes et al., 2016; Gautério et al., 2021; Šelo et al., 2021), amilaze ( $\alpha$ -amilaza,  $\beta$ -amilaza, glukoamilaza), pektinaze (endo- i egzo-poligalakturonaza), fitaze, lipaze, proteaze i inulinaze (Arora et al., 2017; El-Bakry et al., 2015). Celulaze su enzimi koji kataliziraju razgradnju celuloze do glukoze, a ksilanaze su ključni enzimi za depolimerizaciju komponenti hemiceluloze, dok amilaze hidroliziraju polisaharide poput škroba i njegovu razgradnju u molekule glukoze, maltoze i dekstrina. Nadalje, pektinaze sudjeluju u razgradnji pektina (El-Bakry et al., 2015; Šelo et al., 2021), a proteaze kataliziraju hidrolizu peptidne veze, inulinaze hidroliziraju inulin u fruktozu, dok lipaze razgrađuju triacilglicerole u slobodne masne kiseline i glicerole. Osim toga, lipaze kataliziraju hidrolizu i transesterifikaciju drugih estera kao i sintezu estera i pokazuju enantioselektivna svojstva (El-Bakry et al., 2015; Gautério et al., 2021; Singh i Mukhopadhyay, 2012). Fitaza je važan enzim u proizvodnji stočne hrane jer katalizira hidrolizu fitinske kiseline, antinutrijenta prisutnog u žitaricama, sjemenkama itd. (Arora et al., 2017).

Bazidiomicete, askomicete i zigomicete su gljive koje se najčešće koriste u SSF procesima. U **Tablici 1.** navedeni su primjeri filamentoznih gljiva uzgajanih na različitim supstratima u uvjetima SSF-a te dobiveni produkti. Bazidiomicete: *Trametes versicolor*, *Trametes pubescens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Ganoderma*

*lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Pleurotus ostreatus* i *Bjerkandera adusta* (Ajila et al., 2011; Batool et al., 2013; Bucić-Kojić et al., 2017; Chen et al., 2017; Dulf et al., 2016; Elisashvili et al., 2009; Ibarra-Cantún et al., 2020; Wan i Li, 2010), koje pripadaju gljivama bijelog truljenja, zatim askomicete: *Humicola grisea*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ibericus*, *Ceratocystis fimbriata*, *Thermoascus aurantiacus* i *Thermomyces lanuginosus* (Dulf et al., 2018; Feitosa et al., 2020; Filipe et al., 2020; Martins et al., 2002; Masui et al., 2012; Šibalić et al., 2020; Soares et al., 2000) te zigomicete: *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus delemar* i *Mortierella alpina* (Benabda et al., 2019; Dulf et al., 2016; Ferreira et al., 2020; Pathania et al., 2018) neki su od primjera filamentoznih gljiva koje se koriste za biološku obradu različitih supstrata poput pivskog tropa, pljevice ječma, pšenične slame i drugih proizvodnih ostataka s ciljem poboljšanja njihove nutritivne vrijednosti i proizvodnje enzima te sekundarnih metabolita poput fenolnih spojeva.

**Tablica 1.** Filamentozne gljive korištene za proizvodnju enzima i drugih proizvoda s dodanom vrijednošću tijekom SSF-a na različitim supstratima

Microorganizam	Supstrat	Produkt	Reference
<b>Bazidiomicete</b>			
<i>T. versicolor</i>	trop rajčice, pivski trop, kukuruzna silaža, pljevica ječma, ljuska jajeta	lakaza, ksilanaza, proteaza, mangan peroksidaza, kafeinska kiselina, vanilinska kiselina, <i>p</i> -hidroksibenzojeva kiselina, siringinska kiselina	Bucić-Kojić et al., 2017; landolo et al., 2011; Tišma et al., 2018, Tišma et al., 2020
<i>T. pubescens</i>	kora banane	lakaza	Dulf et al., 2016
<i>P. chrysosporium</i>	jabučni trop	antioksidansi	Ajila et al., 2011
<i>C.subvermispora</i>	kukuruzovina	enzimska hidroliza i proizvodnja etanola	Wan i Li, 2010
<i>G. lucidum</i>	pšenična slama	lignin peroksidaza	Batool et al., 2013
<i>G. resinaceum</i>	piljevina, mekinje, kukuruzno brašno	polisaharidi, triterpenoidi	Chen et al., 2017
<i>P. ostreatus</i>	kora krumpira, pšenične mekinje, trop rajčice, ostaci svježeg ananasa, rižina slama, ostaci jabuka i agave	ligninolitčki enzimi, ksilanaza, proteaza, bioaktivni fenolni spojevi, flavonoidi, triterpeni	Elisashvili et al., 2009; landolo et al., 2011; Ibarra-Cantún et al., 2020; Ozcirak Ergun i Ozturk Urek, 2017; Rashad et al., 2016
<i>B. adusta</i>	pšenične mekinje	karboksimetil celuaza, mangan peroksidaza, lakaza, ksilanaza	Elisashvili et al., 2009
<b>Askomicete</b>			
<i>H. grisea</i>	pšenične mekinje, sojini proteini i vlakna, mljevena soja, klip kukuruza,	ksilanaza, $\beta$ -glukozidaza	Masui et al., 2012

Microorganizam	Supstrat	Produkt	Reference
	kukuruzne klice, bagasa i slama šećerne trske, kukuruzovina, rižine ljuske, ljuska kikirikija, ljuska kave		
<i>A. niger</i>	komina marelice, brašno sjemenki granadile, listovi moringe, šećerna melasa	neoklorogenska kiselina, klorogenska kiselina, rutin, kvercetin-glukozid, glukonska kiselina	Dulf et al., 2017; Feitosa et al., 2020; Santos et al., 2021; A. Sharma et al., 2008
<i>A. niger</i> <i>A. ibericus</i>	komina masline, nusproizvodi vinarije	bioaktivne komponente	Filipe et al., 2020
<i>A. niger</i>	komina aronije	cimetna kiselina, flavonoli	Dulf et al., 2018
<i>C. fimbriata</i>	ljuska kave	voćna aroma	Soares et al., 2000
<i>T. aurantiacus</i>	otpad naranče, šećerna trska, pšenične mekinje	pektinaze	Martins et al., 2002
<i>T. lanuginosus</i>	ostaci nakon proizvodnje bučinog ulja	lipaze	Šibalić et al., 2020
<b>Zigomicete</b>			
<i>R. oligosporus</i>	ostaci šljiva, komina marelice	veći prinos lipida, izokvercetin, neoklorogenska kiselina, klorogenska kiselina, rutin, kvercetin-glukozid	Dulf et al., 2016, Dulf et al., 2017
<i>R. oryzae</i>	ostaci kruha	proteaza, amilaza	Benabda et al., 2019
<i>R. delemar</i> F2	jabučni trop	karbohidraze	Pathania et al., 2018
<i>M. alpina</i>	pogača uljane repice, sojina, suncokretova i lanena pogača	poboljšana nutritivna vrijednost	Ferreira et al., 2020

Filamentozne gljive koje se koriste u SSF procesima pripadaju skupini mikroorganizama koji su generalno prihvaćeni kao sigurni (engl. *Generally Recognized as Safe, GRAS*) te se neke od spomenutih vrsta (*A. oryzae*, *R. oryzae*, *R. oligosporus*, *Monascus purpureus*) tradicionalno koriste u proizvodnji fermentiranih namirnica kao što su tempeh, koji i ang-kak („crvena riža“) te autohtonih japanskih namirnica sake, shoyu i miso (Karimi et al., 2018; Londoño-Hernández et al., 2017; Mitchell i sur., 2006). Brojne filamentozne gljive posjeduju ljekovita svojstva te su se kroz povijest čovječanstva koristile u medicinske svrhe, a i danas se intenzivno proučavaju. Neke od njih su *Coriolus versicolor* ili *Polyporus versicolor*, iako sinonimi, ovo su stari nazivi, dok se po novoj taksonomiji koristi naziv *T. versicolor* poznata kao puranov rep (**Slika 2.4.a**), zatim *Ganoderma lucidum* (**Slika 2.4.b**) poznatija kao reishi, odnosno hrastova sjajnica (Fokunang et al., 2022; Tišma et al., 2021).



Slika 2.4. *T. versicolor* (a) i *G. lucidum* (b) (Fokunang et al., 2022)

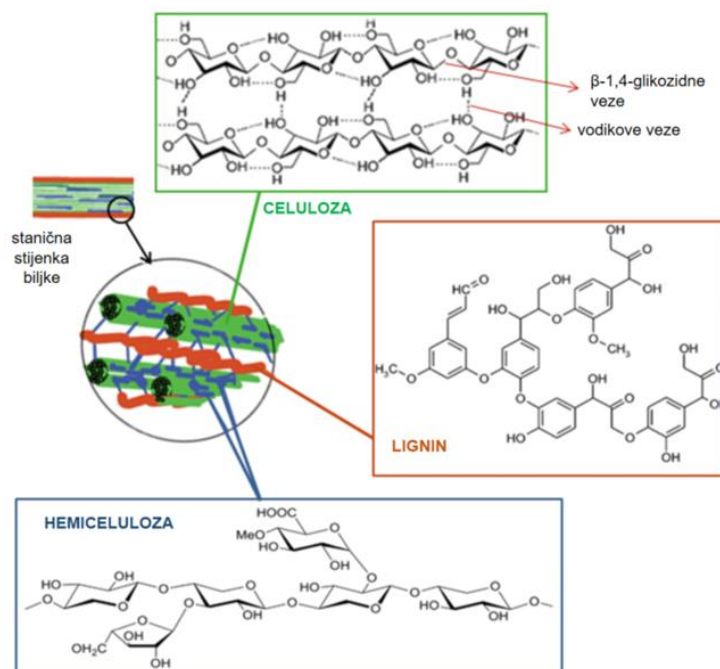
### 2.4.3. Supstrati u fermentaciji na čvrstim nosačima

Nosači u SSF-u mogu biti inertni odnosno sintetički materijali poput poliuretanske pjene (Ferreira et al., 2021) i sintetske smole (Naser et al., 2020) ili ne-inertni, prirodni materijali poput raznih proizvodnih ostataka, kao što su: trop grožđa, bagasa šećerne trske, pljevica ječma, pšenične mekinje, talog kave, pšenična slama, kukuruni klipovi, rižina slama, repini rezanci, otpad zaostao nakon proizvodnje maslinovog ulja, pogača zaostala nakon proizvodnje hladno prešanog bučinog ulja itd. (Alarcón et al., 2022; Rodríguez-Couto, 2018; Šibalić et al., 2020; Teles et al., 2019; Tišma, et al., 2021; Yilmazer et al., 2021). Inertni nosači služe samo kao nosač za rast mikroorganizama, dok neinertni nosači služe kao nosač za rast i kao izvor hranjivih tvari potreban za rast mikroorganizama, odnosno kao supstrat (Rodríguez-Couto, 2018). Proizvodni ostaci smatraju se prikladnima za pretvorbu u komercijalne proizvode s obzirom da imaju visok udio organskih tvari te se mogu koristiti kao potencijalni supstrat za dobivanje proizvoda s dodanom vrijednošću pomoću SSF tehnologije (Chilakamarry et al., 2022). Primjenom SSF-a dobiveni su proizvodi kao što su zakiseljivači, konzervansi i pojačivači okusa s mogućom primjenom u prehrambenoj industriji te sekundarni metaboliti (fenolne bioaktivne komponente, antibiotici, tvari arome) i enzimi koji se mogu primijeniti u prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj, kemijskoj, tekstilnoj industriji, industriji papira itd. (Chilakamarry et al., 2022; El-Bakry et al., 2015; Kumar et al., 2021; Lessa et al., 2018; Singh i Mukhopadhyay, 2012; Souza i Magalhães, 2010). Biološki obrađeni proizvodni ostaci mogu se koristiti kao sredstva za bioremedijaciju, sredstva za biokontrolu, za proizvodnju biogoriva, funkcionalne hrane, hrane za životinje, kompozitnih materijala itd. (Chilakamarry et al., 2022; Tišma et al., 2021).

Spomenuti proizvodni ostaci koji se koriste kao supstrati u SSF-u su obično lignocelulozni materijali, koji su vrlo kompleksni i heterogeni te je potrebno poznavati njihov kemijski sastav s obzirom da tijekom biološke obrade dolazi do razgradnje složene lignocelulozne strukture uslijed biokatalitičkih aktivnosti primijenjenog mikroorganizma (Šelo et al., 2021). Osnovne komponente lignocelulozne strukture su lignin, celuloza i hemiceluloza, zastupljeni u različitim

količinama i omjerima, ovisno o podrijetlu lignocelulozne biomase. Također sadrži pektin, proteine, ekstraktibilne tvari i anorganske spojeve (El-Bakry et al., 2015; Tišma et al., 2021). Shematski prikaz lignina, celuloze i hemiceluloze kao glavnih komponenti lignocelulozne biomase prikazan je na **Slici 2.5**.

Celuloza je linearni polimer koji čine od stotine do preko deset tisuća molekula glukoze povezanih  $\beta$ -1,4 glikozidnim vezama te je ujedno i najzastupljenija komponenta lignocelulozne biomase (Horn et al., 2012; Park et al., 2010). Hemiceluloza je heteropolimer koji se sastoji od kratkih, linearnih i razgranatih lanaca različitih heksoza, pentoza i šećernih kiselina. Uobičajene hemiceluloze su galaktani, ksilani, manani i arabani. Hemiceluloze se mogu lakše enzimski razgraditi u odnosu na celulozu. Međutim, određene oligomerne strukture su teže razgradive zbog složenih načina grananja i acetilacije (Horn et al., 2012).



**Slika 2.5.** Osnovne komponente lignocelulozne biomase i njihove kemijske strukture (Baslyman, 2015)

Lignin je složen, amorfan i strukturno raznolik aromatski heteropolimer, s umreženim racemskim makromolekulama te je relativno hidrofoban. Ispunjava prostor između hemiceluloze i prekriva celulozni kostur čineći lignocelulozne matrice. Dominantne strukturne komponente lignina su monolignoli: *p*-kumarilni alkohol, koniferilni alkohol i sinapilni alkohol povezani C–O i C–C vezama. Ove tri jedinice razlikuju se po broju metoksi skupina u svojim fenolnim prstenovima (Horn et al., 2012; Tišma et al., 2021).

Do razgradnje složene lignocelulozne strukture i proizvodnje sekundarnih metabolita dolazi uslijed mikrobne proizvodnje kompleksnog sustava enzima koji kataliziraju različite

biotransformacijske procese, stoga SSF može imati višestruki pozitivan učinak na lignocelulozne materijale u smislu njihovog obogaćivanja biološki aktivnim spojevima, poput masnih kiselina, vitamina i fenolnih kiselina s visokim antioksidacijskim potencijalom, kao i poboljšanja njihove hranjive vrijednosti (Bucić-Kojić et al., 2020; Dulf et al., 2020; Filipe et al., 2020).

#### 2.4.4. Trop grožđa u fermentaciji na čvrstim nosačima

Trop grožđa (ili pojedini sastojci poput sjemenki i peteljki) se može koristiti kao supstrat u SSF za proizvodnju različitih lignolitičkih enzima (lakaza, mangan peroksidaza, lignin peroksidaza) (Fernandes et al., 2020; Rodríguez Couto et al., 2006), hidrolitičkih enzima (celulaza, ksilanaza,  $\beta$ -glukozidaza, tanaza, poligalakturonaza, pektinaza, endoglukanaza) (Filipe et al., 2020; Leite et al., 2019), antioksidanasa (Filipe et al., 2020),  $\gamma$ -linoleinske kiseline i karotenoida (Dulf et al., 2020) te za povećanje prinosa fenolnih tvari (Bucić-Kojić et al., 2020; Zambrano et al., 2018). Primjeri upotrebe tropa grožđa kao supstrata u SSF-u, korištenih filamentoznih gljiva te dobivenih produkata navedeni su u **Tablici 2**.

U posljednje vrijeme je sve više istraživanja posvećeno povećanju prinosa ekstraktibilnih fenolnih spojeva pomoću SSF bioprocasa jer ova tehnologija predstavlja jeftinu i ekološki prihvatljivu alternativu različitim otapalima i skupim komercijalnim enzimima te se u brojnim istraživanjima koristi kao predtretman prije same ekstrakcije bioaktivnih tvari. Visoki udio lignina u tropu grožđa može imati negativan utjecaj na rast mikroorganizma i proizvodnju enzima (pektinaze, celulaze, tannaze,  $\beta$ -glukozidaze) koji sudjeluju u hidrolizi i oslobađanju fenolnih spojeva povezanih s polisaharidima u strukturi supstrata (Filipe et al., 2020; Teles et al., 2021). Ponekad se u SSF procesu tropu grožđa dodaju induktori poput pšeničnih mekinja, kao dodatak hranjivih tvari, pospješujući rast mikroorganizama i sintezu enzima od interesa (Teles et al., 2019, Teles i sur. 2021). S ciljem poboljšanja proizvodnje hidrolitičkih enzima i antioksidanasa iz komine masline, Filipe i sur. (2020) su kao supstrat u SSF procesu koristili mješavinu komine masline s nusproizvodima iz vinarije, što se pokazalo učinkovito u proizvodnji enzima ksilanaze i  $\beta$ -glukozidaze te u poboljšanju antioksidacijske aktivnosti mješavine supstrata biološki obrađene s *A. niger* i *A. ibericus*, pri čemu je antioksidacijska aktivnost bila 2,2 puta veća u odnosu na biološki neobrađeni supstrat. Melanouri i sur. (2022) također su kombinirali trop grožđa s različitim supstratima (pšenična slama, piljevina, klipovi kukuruza, ostaci kave, pulpa masline, ječmena i zobena slama, ljuska riže) kako bi ispitali njihov utjecaj na uzgoj *P. ostreatus* i *P. eryngii* u SSF uvjetima. Supstrati su pripremljeni miješanjem u određenim omjerima s ciljem osiguravanja što povoljnijih uvjeta za rast gljiva, osiguravajući potrebne hranjive tvari i omjer C/N = 20 – 30.

Zambrano i sur. (2018) su svoje istraživanje proveli na tropu grožđa osušenom pri temperaturi od 65 °C i na liofiliziranom tropu grožđa pri čemu je ostvaren porast prinosa ekstraktibilnih fenolnih spojeva nakon biološke obrade s *Rhizomucor miehei*. Maksimalni prinos galne kiseline, katehina i epikatehina ostvaren je nakon sedam dana biološke obrade liofiliziranog tropa, dok je u slučaju osušenog tropa grožđa povećan prinos samo galne kiseline nakon sedam dana biološke obrade.

Nadalje, trop grožđa je korišten kao supstrat u SSF u svrhu proizvodnje  $\gamma$ -linoleinske kiseline i karotenoida (Dulf et al., 2020), sredstva za biokontrolu (Bai et al., 2008) te za uzgoj plodnih tijela gljiva *P. ostreatus* i *Pleurotus pulmonarius* (Papadaki et al., 2019).

**Tablica 2.** Primjeri korištenih mikroorganizama u SSF procesima gdje je kao supstrat korišten proizvodni ostatak prerade grožđa

Mikroorganizam	Supstrat	Produkt	Reference
<i>Trametes hirsuta</i>	sjemenke grožđa	lakaza	Rodríguez Couto et al., 2006
<i>G. resinaceum</i> , <i>Irpex lacteus</i> , <i>B. adusta</i> , <i>T. versicolor</i> , <i>Phlebia rufa</i>	peteljke grožđa	lakaza, mangan peroksidaza, lignin peroksidaza, celulaza, ksilanaza, polisaharidi	Fernandes et al., 2020
<i>Actinomucor elegans</i> , <i>Umbelopsis isabellina</i>	trop grožđa	$\gamma$ -linoleinska kiselina, karotenoidi	Dulf et al., 2020
<i>Trichoderma viride</i>	trop grožđa	biokontrolna sredstva	Bai et al., 2008
<i>A. niger</i> , <i>A. ibericus</i>	mješavina komine masline i tropa grožđa	$\beta$ -glukozidaza, celulaza, ksilanaza, antioksidanti	Filipe et al., 2020
<i>A. niger</i> , <i>A. ibericus</i> , <i>R. oryzae</i>	trop grožđa, peteljke grožđa	$\beta$ -glukozidaza, celulaza, ksilanaza, antioksidanti	Leite et al., 2019
<i>A. niger</i>	mješavina tropa grožđa i pšeničnih mekinja	celulaza, ksilanaza, tanaza, $\beta$ -glukozidaza, poligalakturonaza, povećanje prinosa bioaktivnih komponenti	Teles et al., 2019, Teles et al., 2021
<i>Aspergillus awamori</i>	trop grožđa	ksilanaza, pektinaza	Botella et al., 2007
<i>T. versicolor</i>	trop grožđa	povećanje prinosa bioaktivnih komponenti	Bucić-Kojić et al., 2020
<i>R. miehei</i>	liofilizirani trop grožđa	povećanje prinosa fenolnih tvari	Zambrano et al., 2018
<i>P. eryngii</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>P. pulmonarius</i>	trop grožđa	lakaza, endoglukanaza, jestive gljive	Melanouri et al., 2022; Papadaki et al., 2019
<i>A. niger</i>	mješavina tropa grožđa i kore naranče	ksilanaza, celulaza, egzopoligalakturonaza	Díaz et al., 2013



### 2.4.5. Bioreaktori za fermentaciju na čvrstim nosačima

Unatoč brojnim prednostima SSF-a u odnosu na SmF, istinski potencijal ove tehnologije nije u potpunosti ostvaren u industrijskom mjerilu. Glavni razlozi za to su nedostatak procesne opreme te dizajna bioreaktora s razvijenim automatiziranim sustavom upravljanja i matematičkim modelima za simuliranje procesa, što je neophodno za rješavanje glavnih problema upravljanja i kontrole SSF procesa poput osiguravanja što homogenijeg supstrata, održavanja ravnomjernog prozračivanja i temperature te sterilnih uvjeta rada. Kao rezultat toga, još uvijek postoji niz istraživanja koja se bave razvojem SSF bioreaktora za učinkovitiju biotehnološku primjenu (Arora et al., 2018; Kumar et al., 2021). S obzirom na izazove u pogledu dizajna učinkovitih velikih bioreaktora za primjenu u industrijskom mjerilu, u literaturi se vezano za ovu tematiku često koristi izraz „*scale-up* problem“ (Mitchell i sur., 2006b).

Prilikom dizajniranja i konstruiranja bioreaktora glavni cilj je omogućiti uspješno kontroliranje optimalnih uvjeta za rast mikroorganizma i nastajanje produkata tijekom čitavog trajanja SSF procesa. Međutim, rast mikroorganizma tijekom odvijanja procesa kroz oslobađanje metaboličke topline i potrošnju O<sub>2</sub> uzrokuje odstupanja od optimalnih uvjeta postavljenih na početku procesa (Mitchell i sur., 2006b). Fenomeni prijenosa su od presudne važnosti u kontroli rada bioreaktora, a osnovna fiziologija mikroorganizma je neovisna o razmjeru bioreaktora. Drugim riječima, u oba bioreaktora brzina rasta i oslobađanja topline biti će jednaka pri danoj kombinaciji koncentracije O<sub>2</sub>, hranjivih tvari, pH, temperature i aktiviteta vode (Mitchell i sur., 2006b).

Na temelju opsega rada, SSF bioreaktori se mogu kategorizirati u dvije skupine:

1. laboratorijski bioreaktori
2. poluindustrijski i industrijski bioreaktori.

S obzirom na značajke dizajna, princip rada, primjene i ograničenja, bioreaktori se kategoriziraju u sljedeće skupine (Arora et al., 2018; El-Bakry et al., 2015; Mitchell et al., 2006c):

1. bioreaktori s pliticama (engl. *tray bioreactor*)
2. bioreaktori s nosačima biomase (engl. *packed bed bioreactors*)
3. bioreaktori s povremenim ili kontinuiranim miješanjem (engl. *intermittent or continuously mixed bioreactors*)
4. bioreaktori s prisilnom aeracijom i miješanjem (engl. *forcefully aerated agitated bioreactors*).

Svaki od navedenih tipova bioreaktora imaju svoje prednosti i nedostatke, a primjenu nalaze najčešće u proizvodnji enzima, zatim organskih kiselina, antioksidanasa, antibiotika,

pigmenata, kemikalija, spora itd. (Arora et al., 2017, 2018; Das et al., 2015; Filipe et al., 2020). Od navedenih bioreaktora, najviše se primjenjuje bioreaktor s pliticama koji je korišten i u izradi ove disertacije.

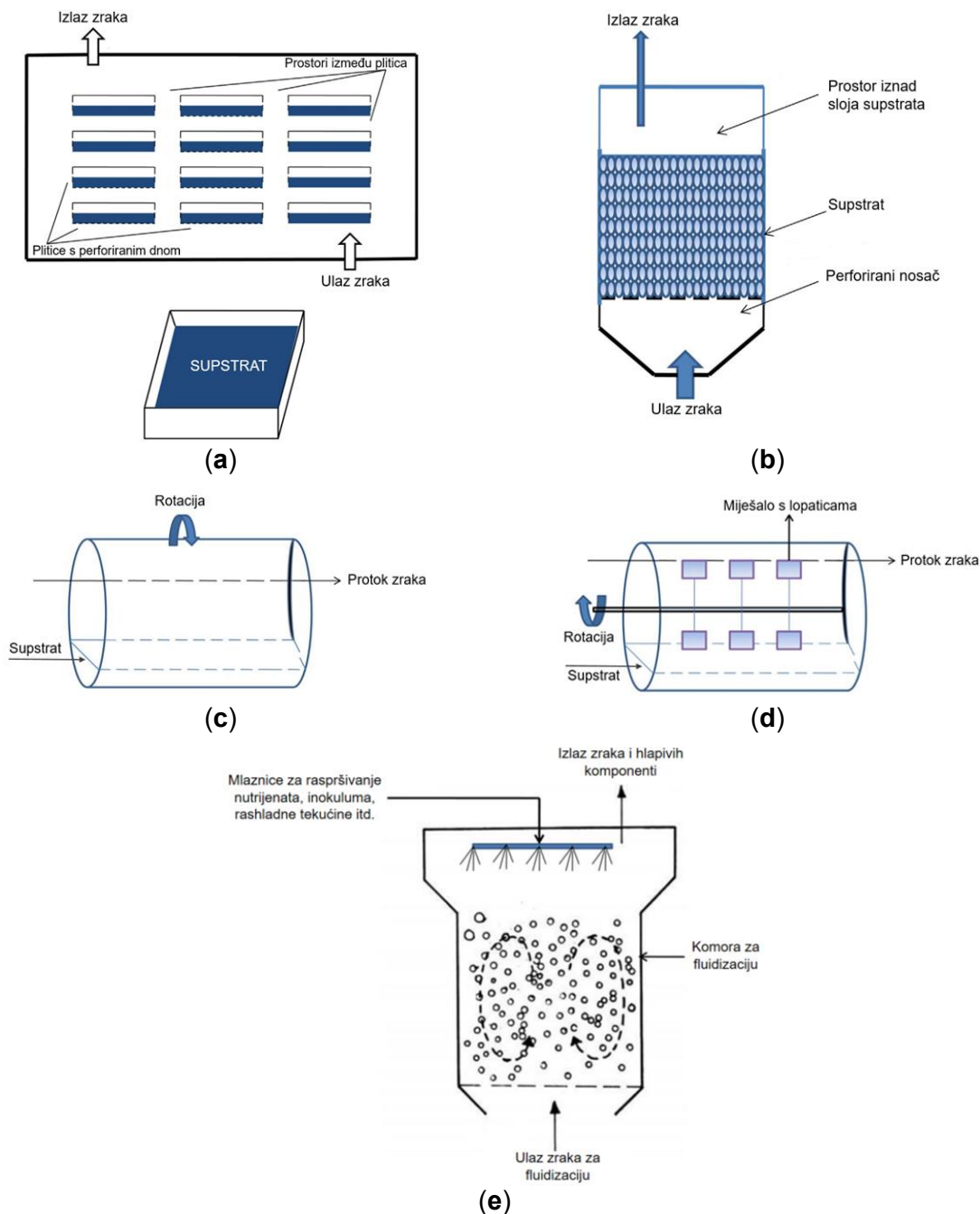
Bioreaktori s pliticama su tradicionalna vrsta bioreaktora koji se primjenjuju u SSF. Obično se sastoje od komore koja sadrži veliki broj pojedinačnih plitica, poslaganih jedna iznad druge s određenim razmakom između njih. Kondicionirani zrak (uz kontrolu vlažnosti i temperature) se upuhuje u komoru i cirkulira oko plitica. Za procese koji zahtijevaju određenu razinu asepticnosti, upuhuje se sterilni zrak. Iako je ovaj tip bioreaktora nominalno statičan, sloj supstrata na plitici se može povremeno miješati, što se obično provodi ručno jednom ili dva puta dnevno za procese koji ne zahtijevaju sterilne uvjete. Same plitice mogu biti izrađene od drveta, bambusa, metala ili plastike. Obično su otvorene na vrhu i mogu biti izrađene s perforacijama, kako bi se povećala dostupnost O<sub>2</sub>, ili bez perforacija. Umjesto plitica mogu se koristiti i mikroperforirane plastične vrećice koje sadrže supstrat (Arora et al., 2018; Kumar et al., 2021; Mitchell et al., 2006c). Shematski prikaz bioreaktora s pliticama prikazan je na **Slici 2.6.a**.

Bioreaktor s pliticama u SSF procesima se tradicionalno koristi za proizvodnju fermentirane hrane kao što su tempeh, miso, koji i soja sos (Arora et al., 2018).

Prijenos topline u bioreaktoru s pliticama odvija se kombinacijom konvekcije i kondukcije te zbog niske toplinske vodljivosti supstrata često se ne postiže učinkovita disipacija topline, što ograničava visinu sloja supstrata na maksimalno 5 cm. To je ujedno i razlog zašto se uvećanje mjerila procesa ne može odvijati povećanjem visine sloja supstrata na plitici, nego povećanjem površine i/ili povećanjem broja plitica. Prednosti ovog tipa bioreaktora su jednostavnost dizajna i uvećanja mjerila, a glavna ograničenja su nemogućnost precizne kontrole temperature i udjela vlage. Kada se radi o uvećanju mjerila, ovaj tip bioreaktora zahtijeva veliku prostornu površinu, a samim time i potrebu za ručnim rukovanjem ili za visoko sofisticiranim robotskim sustavima. Također, nije jednostavno osigurati sterilne uvjete rada tijekom čitavog trajanja procesa te bi se u tu svrhu trebale primjenjivati velike prostorije s mogućnošću sterilizacije, što može biti neisplativo (Arora et al., 2018; Mitchell et al., 2006d).

Rodríguez Couto i sur. (2006) proveli su biološku obradu sjemenki grožđa pomoću gljive bijelog truljenja *T. hirsuta* s ciljem proizvodnje lakaze. Proces je proveden pri 30 °C, uz pasivno prozračivanje, bez miješanja u bioreaktoru volumena 1,8 L pri čemu su sjemenke grožđa (90 g) korištene kao nosač / supstrat (visina sloja 1 cm) koji je inokuliran s 10 micelijskih diskova promjera 3 mm. U ovom eksperimentu postignuta je trostruko veća aktivnost lakaze nego u procesu provedenom pri istim uvjetima koristeći najlonsku spužvu kao inertni nosač. Filipe i sur. (2020) koristili su bioreaktor s pliticama za proizvodnju enzima ksilanaze, celulaze i

$\beta$ -glukozidaze te za proizvodnju antioksidanata iz komine masline pomiješane s nusproizvodima vinarije gdje su pri optimalnim uvjetima maksimalne specifične aktivnosti ksilanaze, celuloze i  $\beta$ -glukozidaze iznosile  $189,1 \pm 26,7$  U/g,  $56,3 \pm 2,1$  U/g i  $10,9 \pm 0,8$  U/g.



**Slika 2.6.** Shematski prikaz: bioreaktora s pliticama i pojedinačne plitice (a), tradicionalnog bioreaktora s nosačima biomase (b), bioreaktora s rotirajućim bubnjem (c), bioreaktora sa statičnim bubnjem koji sadrži miješalo (d) i bioreaktora s fluidiziranim zračno-čvrstim slojem (e) (Arora et al., 2018)

Bioreaktor s plastičnim pliticama korišten je za proizvodnju fumarne kiseline pomoću *R. oryzae*. Kao supstrat u SSF procesu korišten je jabučni trop, pri čemu je prinos fumarne kiseline nakon 14 dana fermentacije iznosio  $52 \pm 2,1$  g/kg<sub>s.t.</sub> (Das et al., 2015). Za proizvodnju enzima fitaze pomoću *R. oryzae* u bioreaktoru s pliticama kao glavni supstrat korištena je mješavina pšeničnih mekinja i lanena pogača (1:1). Ispitane su različite količine supstrata na plitici (50 – 1000 g) koje su rezultirale različitom visinom sloja supstrata (0,2 – 2 cm). Povećanje visine sloja supstrata iznad 2 cm značajno je utjecalo na rast mikroorganizma i na proizvodnju fitaze te je rezultiralo smanjenjem prinosa fitaze, što može biti posljedica niske razine kisika i udjela vlage uslijed visoke stope opterećenja supstrata na plitici (Arora et al., 2017). U bioreaktoru s pliticama obično se koristi visina sloja supstrata od 1,5 cm do 2 cm, iako to nije pravilo te može varirati, ovisno o transportnim i kinetičkim parametrima sustava, konfiguraciji bioreaktora i uvjetima rada (Arora et al., 2017).

Bioreaktori s nosačima biomase (Slika 2.6.b) koriste se kada je miješanje nepoželjno ili štetno za rast mikroorganizama. Karakteristika ovog tipa bioreaktora je prisilno prozračivanje kroz statičnu podlogu (supstrat) koje pridonosi regulaciji O<sub>2</sub> i vlage, te ublažava akumulaciju topline i CO<sub>2</sub>. Ovaj tip reaktora nudi bolju kontrolu procesa i mogućnost primjene debljeg sloja supstrata u odnosu na bioreaktor s pliticama. Konstrukcija se općenito sastoji od staklene ili metalne cijevi cilindričnog ili pravokutnog presjeka, u kojoj se nalazi supstrat (Arora et al., 2018; Mitchell et al., 2006c). Unutar ležišta također se mogu osigurati rashladne ploče kako bi se osigurao učinkovit prijenos topline (Arora et al., 2018).

Ovakav tip bioreaktora, kapaciteta do jedne tone supstrata, koristi se u industrijskom mjerilu u proizvodnji koji startera za proizvodnju soja umaka (Churitsu Industry Co. Ltd., Tokio, Japan), međutim, detalji o procesu i izvedbi bioreaktora nisu dostupni (Mitchell et al., 2006e). Bioreaktori s nosačima biomase imaju široku primjenu u mliječnoj, poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji, industriji pića, proizvodnji lijekova, kao i u pročišćavanju otpadnih voda. U brojnim slučajevima korišteni su za proizvodnju bioetanola i biodizela (Sen et al., 2017).

Ovi bioreaktori mogu zamijeniti konvencionalne šaržne bioreaktore uz značajne operative prednosti i smanjenje troškova. Jedan od glavnih ciljeva korištenja takvih reaktora je kontinuirani način rada, koji omogućuje jednostavno praćenje i kontrolu radnih varijabli te daje visok prinos željenog proizvoda. U ovom tipu bioreaktora koriste se imobilizirani enzimi, a u brojnim slučajevima i imobilizirane mikrobne stanice (zarobljene u matriksu ili u obliku biofilma), što olakšava konačnu biotransformaciju i sintezu željenog ciljanog produkta (Sen et al., 2017).

Bioreaktori s povremenim ili kontinuiranim miješanjem uključuju bioreaktore s rotirajućim bubnjem (engl. *rotating-drum bioreactors*) i bioreaktore sa statičnim bubnjem i miješanjem (engl. *stirrer-drum bioreactors*) (**Slike 2.6.c,d**). To su bioreaktori u kojima se sloj supstrata miješa kontinuirano ili povremeno (s razmakom od nekoliko minuta ili sati). Obično se sastoje od bubnja cilindričnog presjeka koji je postavljen vodoravno i djelomično je ispunjen supstratom, a zrak se uvodi u vršni prostor iznad sloja supstrata (engl. *headspace*) i cirkulira oko supstrata. Kod bioreaktora s rotirajućim bubnjem cijeli se bubanj rotira oko svoje središnje osi kako bi se promiješao sloj supstrata. U bioreaktoru sa statičnim bubnjem i miješanjem, sam bubanj ostaje nepomičan, dok se unutar bubnja rotiraju lopatice postavljene na osovinu koja ide duž središnje osi bioreaktora (Arora et al., 2018; Mitchell et al., 2006f).

Bioreaktori u ovoj kategoriji uključuju blago miješanje i prozračivanje radi poboljšanja rasta mikroorganizama te boljeg prijenosa topline i mase, međutim uslijed prejakog miješanja može doći do oštećenja micelija. Unutrašnjost bubnja bioreaktora može sadržavati pregrade različitih veličina koje olakšavaju miješanje supstrata (Arora et al., 2018).

Optimalno punjenje bioreaktora supstratom, odnosno punjenje koje omogućuje da se iskoristi što je moguće veći volumen bubnja, a da se pri tome ne ugrozi učinkovitost miješanja, mora se eksperimentalno odrediti za svaku pojedinu kombinaciju supstrata i mikroorganizma (Mitchell et al., 2006f).

Bioreaktori s prisilnom aeracijom i miješanjem mogu biti u dvije izvedbe, kao: bioreaktori s prisilnom aeracijom i kontinuiranim miješanjem te bioreaktori s prisilnom aeracijom i povremenim miješanjem (El-Bakry et al., 2015; Mitchell et al., 2006c). Izbor između kontinuiranog i povremenog miješanja ovisi o osjetljivosti korištenog mikroorganizma na djelovanje sile smicanja tijekom miješanja i o svojstvima čestica supstrata kao što su mehanička čvrstoća i ljepljivost. Njihova prednost u odnosu na bioreaktore bez miješanja i aeracije je mogućnost ravnomjernog dodavanja vode tijekom postupka miješanja te sprječavanje velikog pada tlaka unutar sloja supstrata uslijed miješanja. Prednost bioreaktora s prisilnom aeracijom i povremenim miješanjem je minimiziranje štetnih učinaka koje kontinuirano miješanje može imati na rast mikroorganizma (Mitchell et al., 2006g).

Različiti načini na koje se miješanje može osigurati su: mehaničko miješanje s unutarnjom miješalicom (ležište s vertikalnom miješalicom ili bubanj s prisilnom aeracijom i središnjom miješalicom), miješanje uzrokovano pomicanjem samog bubnja i miješanje uzrokovano strujanjem zraka. Određeni tipovi bioreaktora koji su dizajnirani za kontinuirano miješanje mogu se koristiti i u načinu povremenog miješanja pri čemu je važno osigurati ravnomjernu aeraciju supstrata (Mitchell et al., 2006g).

U ovu skupinu bioreaktora ubrajaju se bioreaktori s vibrirajućim bubnjem (engl. *rocking drum bioreactors*), bioreaktori s fluidiziranim plinovito-čvrstim slojem (engl. *gas-solid fluidized beds*) i različite vrste bioreaktora s aeracijom i miješanjem (engl. *stirred-aerated bioreactors*) (Arora et al., 2018; Mitchell et al., 2006g).

Kod bioreaktora s fluidiziranim plinovito-čvrstim slojem zrak se upuhuje prema gore kroz perforiranu osnovnu ploču dovoljnom brzinom da fluidizira sloj supstrata. Takvi bioreaktori se mogu koristiti i za anaerobne procese ukoliko se za fluidizaciju koristi dušik (Arora et al., 2018; Mitchell et al., 2006g). Na **Slici 2.6.e.** dan je shematski prikaz bioreaktora s fluidiziranim zračno-čvrstim slojem (engl. *air-solid fluidized bed bioreactor*). Fluidizacija učinkovito povećava površinu supstrata dostupnu za rast mikroorganizama i učinkovit prijenos topline, međutim primjena ovog bioreaktora je ograničena zbog proizvodnje hlapljivih tvari i visokih energetskih zahtjeva (Arora et al., 2018).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak doktorske disertacije bio je:

- ispitati utjecaj različitih načina kruto-tekuće ekstrakcije (ekstrakcija uz zagrijavanje u vodenoj kupelji s tresilicom i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom) i različitih procesnih uvjeta (temperatura, koncentracija otapala, broj okretaja tresilice (rpm), snaga ultrazvuka, vrijeme ekstrakcije) na ekstraktibilnost fenolnih spojeva iz tropa grožđa te definirati optimalne uvjete ekstrakcije za provedena istraživanja
- ispitati mogućnost primjene biološke obrade tropa grožđa pomoću filamentoznih gljiva u SSF uvjetima u svrhu povećanja ekstraktibilnosti fenolnih spojeva iz tropa grožđa
- razviti SSF procese pomoću različitih filamentoznih gljiva u laboratorijskim staklenkama te utvrditi njihov utjecaj na prinos ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima dobivenim iz tropa grožđa te na antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakata
- razviti SSF proces u bioreaktoru s pliticama (engl. *scale-up*) s odabranom filamentoznom gljivom te uspostaviti kontrolirano okruženje za uspješnu provedbu procesa fermentacije (održavanje optimalne temperature i vlage)
- analizirati kemijski sastav tropa grožđa i aktivnost hidrolitičkih enzima (celulaze,  $\beta$ -glukozidaze, ksilanaze, invertaze) i lignolitičkih enzima (lakaze, mangan peroksidaze, lignin peroksidaze) prije i nakon biološke obrade tropa grožđa.

### 3.2. MATERIJALI

#### 3.2.1. Supstrat

U radu su korištena četiri različita uzorka tropa grožđa: cabernet sauvignon iz 2016. (CS 2016.), cabernet sauvignon iz 2017. (CS 2017.) i merlot iz 2020. (M 2020.) iz vinarije Erdut te frankovka iz 2017. (F 2017.) iz vinarije Feričanci, koji su zaostali kao proizvodni ostatak nakon prerade crnog grožđa u vino iz vinogradarske regije Slavonija i hrvatsko Podunavlje. Uzorci su skladišteni pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  te su za potrebe provedbe eksperimenata odmrzavani pri sobnoj temperaturi tijekom 24 sata. Trop grožđa je korišten kao supstrat za uzgoj 11 različitih filamentoznih gljiva u SSF uvjetima.

#### 3.2.2. Mikroorganizmi

Biološka obrada tropa grožđa u laboratorijskim staklenkama provedena je s 11 različitih filamentoznih gljiva: *T. versicolor* TV6 (TV6), *T. versicolor* TV8 (TV8), *T. versicolor* CCBAS



AG613 (TV AG613), *T. gibbosa* (TG), *P. chrysosporium* CCBAS 570 (PC), *C. subvermispora* (CS), *P. eryngii* (PE), *G. lucidum* (GL), *G. resinaceum* (GR), *H. grisea* (HG) i *R. oryzae* (RO).

Kultura *T. versicolor* TV6 je dobivena iz zbirke mikrobioloških kultura *Microbial Culture Collection of the National Institute of Chemistry* (MZKI, Ljubljana, Slovenija); *C. subvermispora*, i *H. grisea* su dobivene iz zbirke mikrobioloških kultura s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu (Zagreb, Hrvatska); *T. versicolor* AG613 i *P. chrysosporium* 570 iz zbirke bazidiomiceta *Culture Collection of Basidiomycetes* (CCBAS Prag, Češka Republika); *T. versicolor* TV8, *T. gibbosa*, *G. lucidum*, *G. resinaceum*, i *P. eryngii* iz zbirke mikrobioloških kultura *Institute for Applied Mycology and Biotechnology* (Celje, Slovenija) i *R. oryzae* iz zbirke mikrobioloških kultura s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Zagreb, Hrvatska).

Svi navedeni mikroorganizmi uzgajani su na krumpirovom agaru pri 27 °C, tijekom tri dana (kultura *R. oryzae*), odnosno tijekom sedam dana (sve ostale kulture).

### 3.2.3. Kemikalije

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela rada korištene su sljedeće kemikalije: BSA otopina – goveđi serumski albumin (Acros Organics, New Jersey, SAD), apsolutni etanol (Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), metanol HPLC čistoće (J.T. Baker, Arnhem, Nizozemska), acetonitril HPLC čistoće (Fisher Chemical, Loughborough, UK), ledena octena kiselina (Macron Fine Chemicals, Gliwice, Poljska), DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhidrazil), galokatehin galat, epikatehin galat, (-)-epikatehin, (+)-katehin hidrat, kafeinska kiselina, elaginska kiselina, galna kiselina, resveratrol, siringinska kiselina, kaempferol, o-kumarinska kiselina, p-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, rutin hidrat, p-hidroksibenzojeva kiselina (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD), procijanidin B1, procijanidin B2 (Extrasynthese, Genay, Francuska), kvercetin, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina (Acros Organics, Geel, Belgija), ε-viniferin (AppliChem, Darmstadt, Njemačka), tirozol, epigalokatehin, klorogenska kiselina, sinapinska kiselina, p-hidroksifenilacetatna kiselina, miricetin (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD), tween-80, DL-arabinoza, maltotrioza, L-ramnoza, natrijev sulfid, n-oktanol (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD), celuloza, D(+)-ksiloza (Kemika, Zagreb, Hrvatska), D(-)-fruktoza, D(-)-riboza, D(+)-celobioza, D(+)-galaktoza, D(+)-maltoza monohidrat, D(+)-manoz, D(+)-saharoz (Acros Organics, Geel, Belgija), D(+)-glukoza (Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Nadalje, korišteni su: natrijev sulfat, natrijev hidroksid, kalijev hidroksid, natrijev klorid, natrijev nitrit, apsolutni etanol, natrijev acetat, natrijev hidrogen fosfat, askorbinska kiselina (Gram Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), natrijev sulfid, 2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil (DPPH), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-

sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), amonijev persulfat, *p*-nitrofenil, ergosterol (Sigma Aldrich, Saint Louis, SAD), bakrov sulfat, 3,5-dinitrosalicilna kiselina (DNS), trolox, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid, veratrilni alkohol, natrijev tetraborat dekahidrat, natrijev dodecil sulfat, heksadeciltrimetilamonij bromid, manganov(II)sulfat monohidrat (Acros Organics, Geel, Belgija), sumporna kiselina, klorovodična kiselina, *n*-heksan (Carlo Erba Reagents GmbH, Emmendingen, Njemačka), natrijev karbonat, kalijev hidrogenftalat, kalijev nitrat, željezov(II)sulfat heptahidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska), aluminijev(III)klorid heksahidrat (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Kandel, Njemačka), krumpirov agar (Biolife Italiana, Milano, Italija), natrijev kalijev tartarat tetrahidrat, etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol dihidrat (EDTA), 2-etoksietanol, 1-butanol, fosforna kiselina (Fisher Chemical, Loughborough, UK), Folin-Ciocalteu reagens (CPAchem, Bogomilovo, Bugarska) i arabinoksilan pšenice (Megazyme d.o.o., Bray, Irska).

### 3.2.4. Uređaji

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela doktorske disertacije korišteni su sljedeći uređaji:

- analitička vaga (Adam Equipment, Nimbus NBL-214i, Kingston, Engleska)
- analizator vlakana (FIWE 3, VELP Scientifica, Usmate Velate, Italy)
- analizator vlage (Mettler Toledo, HR-73, Zürich, Švicarska)
- autoklav (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd, Srbija)
- bioreaktor s pliticama (Euclid d.o.o., Vinkovci, Hrvatska)
- blender (Philips d.o.o., HR 2860, Zagreb, Hrvatska)
- blok za razaranje (Behr Labor-Technik GmbH, Behrotest K12, Düsseldorf, Njemačka)
- centrifuga (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- inkubator (KB 115, BINDER GmbH, Tuttlingen, Njemačka)
- pH metar (pH/ORP HI 2211, HANNA Instruments d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- rotavapor (Büchi B-210, Flawil, Švicarska)
- tehnička vaga (OHAUS PA4102C, OHAUS Europe GmbH, Nänikon, Švicarska)
- TOC analizator (TOC-L<sub>CPH/CPN</sub>, SSM 5000A, Shimadzu, Japan)
- ultracentrifugalni mlin (Retsch ZM200, Haan, Njemačka)
- ultrazvučna kupelj (Elmasonic P 120 H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka)
- univerzalni sustav za ekstrakciju (Büchi B-811 LSV, Flawil, Švicarska)
- uređaj za destilaciju (Behr Labor-Technik GmbH, Behrotest Behr S2, Düsseldorf, Njemačka)
- uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke učinkovitosti (UHPLC Nexera XR, Shimadzu, Kyoto, Japan)

- UV/VIS spektrofotometar (UV-1280, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- vodena kupelj s tresilicom (Julabo, SW-23, Seelbach, Njemačka)
- vorteks (DLab MX-S, Los Angeles, SAD).

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Biološka obrada tropa grožđa

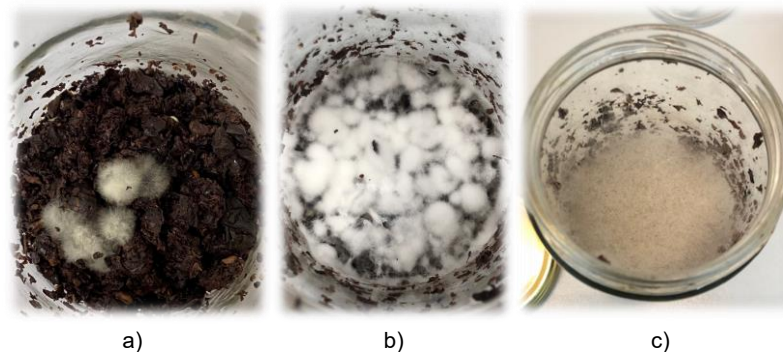
Biološka obrada tropa grožđa provedena je u laboratorijskom mjerilu na dva načina koji su u nastavku zasebno opisani i to u laboratorijskim staklenkama i biorektoru s pliticama. U oba slučaja nakon biološke obrade u trajanju 1 – 5, 10 i 15 dana uzimani su uzorci od kojih je dio korišten za pripremu ekstrakata za mjerenje aktivnosti enzima, a dio je steriliziran kako bi se zaustavio SSF proces. Sterilizirani uzorci su zatim sušeni 48 h pri sobnoj temperaturi i samljeveni do veličine čestica  $\leq 1$  mm pomoću ultracentrifugalnog mlina. Udio suhe tvari u osušenim i samljevenim uzorcima kretao se u rasponu od 88 – 95 %. Uzorci pripremljeni na ovaj način su pohranjeni na +4 °C do analize kemijskog sastava i pripreme tekućih ekstrakata za daljnje analize.

#### ***Biološka obrada tropa grožđa u laboratorijskim staklenkama***

Pedeset grama odmrznutog i blenderom grubo usitnjenog tropa grožđa pomiješano je s 30 mL destilirane vode u laboratorijskim staklenkama volumena 720 mL, potom sterilizirano u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta te ostavljeno da se ohladi na sobnu temperaturu. Trop grožđa je inokuliran s pet micelijskih diskova izuzetih s Petrijevih zdjelica na kojima su uzgajane filamentozne gljive i resuspendiranih u 10 mL sterilne destilirane vode. U slučaju kulture *R. oryzae*, suspenzija spora je pripravljena resuspendiranjem spora, uzgojenih na krumpirovom agaru u Petrijevoj zdjelici, u 0,1 % v/v Tween-80 otopini. Koncentracija spora u pripremljenim suspenzijama iznosila je  $1 \times 10^7$  spora/mL. Udio vlage supstrata nakon inokulacije iznosio je 65 – 75 %. Eksperimenti su provedeni posebno za svaku filamentoznu gljivu pri jednakim uvjetima: inkubacija pri 27 °C u inkubatoru s ventilacijom podešenom na 10 %, tijekom 1 – 5, 10 i 15 dana. Visina sloja supstrata u laboratorijskim teglicama iznosila je 4 – 4,5 cm. Kontrolni uzorak tropa grožđa pripremljen je na isti način, osim što je umjesto suspenzije spora dodana ista količina sterilne vode te je u nastavku rada naveden kao dan „0.“. **Slika 3.1.** prikazuje primjere uzgoja filamentoznih gljiva *P. eryngii*, *T. versicolor* TV6 i *R. oryzae* na tropu grožđa u laboratorijskim staklenkama u SSF uvjetima.

Prema protokolu opisanom u ovom potpoglavlju provedena je SSF pomoću 11 filamentoznih gljiva uz primjenu tropa grožđa sorte cabernet sauvignon iz 2016. kao supstrata u svrhu

screeninga profila fenolnih tvari. Također, isti protokol primijenjen je za SSF pomoću *P. eryngii* i *R. oryzae* na tri različita supstrata, odnosno tri različite sorte tropa grožđa (cabernet sauvignon iz 2017., merlot iz 2020., frankovka iz 2017.) u svrhu *screeninga* profila fenolnih tvari te odabira sorte tropa grožđa i mikroorganizma za uvećanje mjerila SSF procesa.



**Slika 3.1.** Prikaz primjera SSF tropa grožđa u laboratorijskim staklenkama pomoću *P. eryngii* (a), *T. versicolor* TV6 (b) i *R. oryzae* (c)

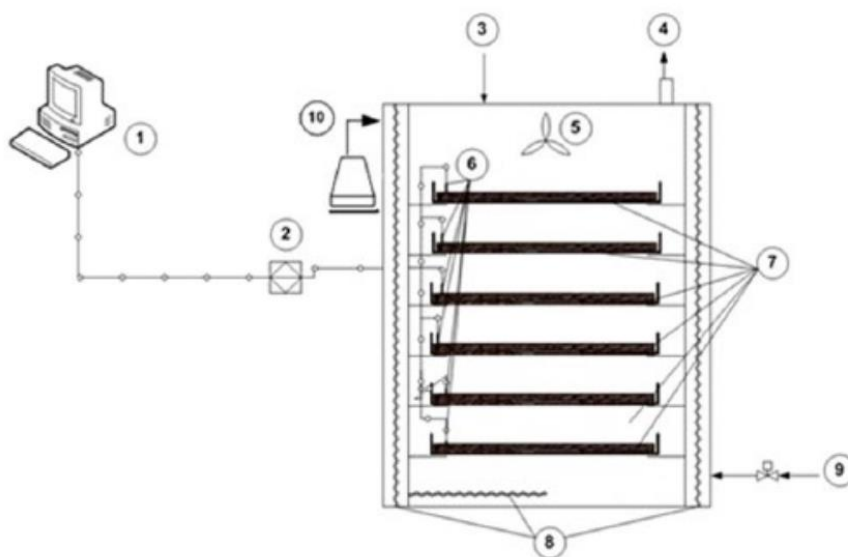
### **Biološka obrada tropa grožđa u bioreaktoru s pliticama**

Nakon biološke obrade tropa grožđa u laboratorijskim staklenkama provedeno je uvećanje mjerila procesa (engl. *scale-up*) u bioreaktoru s pliticama (**Slika 3.2.**). Bioreaktor čini komora od nehrđajućeg čelika, vanjskog promjera 75 × 154 × 70 cm, sa 6 izmjenjivih plitica dimenzija (40 x 50 x 5) cm, te mogućnošću sterilizacije i regulacije procesa (mogućnost regulacije temperature u rasponu 25 – 80 °C, praćenje temperature na svakoj plitici pomoću temperaturnih sondi, regulacija protoka sterilnog zraka (0,5 – 3 L/min), cirkulacija zraka pomoću ventilatora te ovlaživanje zraka pomoću vanjskog spremnika s vodom).

Prije početka eksperimenta, bioreaktor s pliticama je steriliziran pri 121 °C tijekom 15 minuta. Za mjerenje i regulaciju temperature procesa korišten je integrirani PLC sustav (engl. *Programmable Logic Controller*) koji je povezan sa sedam temperaturnih sondi. Jedna sonda mjerila je referentnu temperaturu u bioreaktoru, dok je preostalih 6 sondi služilo za mjerenje temperature u sloju supstrata. U plaštu bioreaktora sa lijeve i desne strane ugrađeni su grijači koji se reguliraju pomoću PLC uređaja. Podešavanje radne temperature (27 °C) kao i praćenje temperature tijekom procesa omogućeno je putem softvera na računalu.

Nakon postignute željene temperature u bioreaktoru (27 °C) na plitice je raspoređen prethodno steriliziran trop grožđa sorte frankovka ( $m = 1150$  g) i ohlađen na sobnu temperaturu, s podešenim udjelom vlage na oko 70 – 75 % dodavanjem 150 mL sterilne vode. Inokulacija supstrata na pliticama je provedena dodavanjem 25 % inokuluma u odnosu na ukupnu masu

supstrata na plitici pri čemu je inokulum lagano ručno izmiješan sa supstatom. Inokulum je pripremljen uzgojem kulture *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama tijekom 5 dana prema protokolu za biološku obradu tropa grožđa u laboratorijskim staklenkama. Količina dodanog inokuluma po jednoj plitici iznosila je 350 g. Udio vlage supstrata nakon inokulacije iznosio je oko 70 %, a visina sloja supstrata na plitici je bila 2 cm. Kontrolni uzorak (dan „0.“) predstavljao je trop grožđa pripremljen sa sterilnom vodom umjesto suspenzijom spora, kao i u SSF-u u laboratorijskim staklenkama. Proces se odvijao uz prirodnu aeraciju bez miješanja, a ovlaživanje zraka unutar bioreaktora provedeno je pomoću vanjskog spremnika sa sterilnom vodom. SSF u bioreaktoru s pliticama provedena je tijekom 1 – 5, 10 i 15 dana.



**Slika 3.2.** Procesna shema bioreaktora s pliticama (1-računalo, 2-PLC sustav, 3-dotok zraka, 4-ispušni ventil, 5-ventilator, 6-temperaturne sonde, 7-plitice, 8-grijači, 9-voda za hlađenje, 10-sustav za ovlaživanje) (Euclid d.o.o., Vinkovci, Hrvatska) (Planinić et al., 2016)

### 3.3.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz tropa grožđa

U cilju postizanja maksimalnog prinosa fenolnih tvari iz tropa grožđa provedena su ispitivanja utjecaja različitih metoda kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih spojeva i ukupnih flavonoida. Ekstrakcija je provedena na biološki neobrađenim uzorcima tropa grožđa primjenjujući dvije metode ekstrakcije, konvencionalnu kruto-tekuću ekstrakciju u vodenoj kupelji i kruto-tekuću ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, koje su opisane u nastavku. U okviru svakog načina ekstrakcije ispitani su procesni parametri koji imaju najveći utjecaj na ekstrakciju ukupnih fenolnih spojeva i ukupnih flavonoida za dani način ekstrakcije. Eksperimenti su provedeni na uzorku tropa grožđa sorte cabernet sauvignon iz 2016., koji je

prije ekstrakcije odmrznut tijekom 24 sata, potom sušen 48 h pri sobnoj temperaturi i samljeven do veličine čestica  $\leq 1$  mm pomoću ultracentrifugalnog mlina.

Nakon analize rezultata odabrana je metoda ekstrakcije (konvencionalna kruto-tekuća ekstrakcija) koja je dalje korištena za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biološki obrađenih uzoraka.

### **Konvencionalna kruto-tekuća ekstrakcija**

Jedan gram osušenog i samljevenog tropa grožđa veličine čestica  $\leq 1$  mm ekstrahiran je s 40 mL vodene otopine etanola u vodenoj kupelji s tresilicom. Ekstrakcija je provedena pri različitim uvjetima pri čemu je mijenjan samo jedan parametar, a ispitani su:

- utjecaj temperature – ekstrakcija je provedena pri temperaturama 40 °C, 60 °C i 80 °C pomoću 50 %-tne vodene otopine etanola, tijekom 30, 60 i 120 minuta, pri broju okretaja tresilice od 200 rpm
- utjecaj otapala – ekstrakcija je provedena pomoću različitih koncentracija otapala odnosno pomoću 50 %, 70 % i 90 %-tne vodene otopine etanola, pri temperaturi 80 °C i broju okretaja tresilice od 200 rpm, tijekom 30, 60 i 120 minuta
- utjecaj broja okretaja tresilice – ekstrakcija je provedena tijekom 30, 60 i 120 minuta pomoću 50 %-tne vodene otopine etanola, pri temperaturi 80 °C i broju okretaja tresilice od 100, 150 i 200 rpm.

### **Kruto-tekuća ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom**

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je provedena pri istom kruto-tekućem omjeru (40 mL/g) kao i konvencionalna ekstrakcija. Pokusi su se provodili u ultrazvučnoj kupelji u *sweep* modu koji osigurava homogenu raspodjelu ultrazvučnih valova unutar kupelji pri 37 kHz tijekom 90 minuta. Ekstrakcija je provedena pri različitim uvjetima pri čemu je mijenjan samo jedan parametar, a ispitani su:

- utjecaj temperature – ekstrakcija je provedena pri temperaturama 40 °C, 60 °C i 80 °C pomoću 50 %-tne vodene otopine etanola, tijekom 15, 60 i 90 minuta pri snazi ultrazvuka 60 % od maksimalne snage
- utjecaj koncentracije otapala – ekstrakcija je provedena pomoću različitih koncentracija otapala odnosno pomoću 50 %, 70 % i 90 %-tne vodene otopine etanola pri

temperaturi 60 °C i snazi ultrazvuka 60 % od maksimalne snage tijekom 15, 60 i 90 minuta

- utjecaj snage ultrazvuka – ekstrakcija je provedena pri snagama ultrazvuka 40 %, 60 % i 80 % od maksimalne snage ultrazvuka pomoću 50 %-tne vodene otopine etanola pri temperaturi 60 °C tijekom 15, 60 i 90 minuta.

### 3.3.3. Analiza fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima tropa grožđa

#### ***Priprema ekstrakata tropa grožđa za analizu fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti***

Jedan gram osušenog i samljevenog tropa grožđa veličine čestica  $\leq 1$  mm ekstrahiran je s 40 mL otapala etanol : voda (1:1) u tikvicama s čepom. Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji s tresilicom pri 80 °C, 200 rpm, tijekom 120 min, u tri paralele. Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani pri 10000  $\times$  g tijekom 10 minuta. Supernatant je dekantiran i korišten za određivanje koncentracije fenolnih spojeva (pojedinačni fenolni spojevi, ukupni fenolni spojevi, ukupni flavonoidi, ukupni ekstraktibilni proantocijanidini) i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata pomoću tri metode (DPPH, FRAP i ABTS metoda).

#### ***Određivanje koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa***

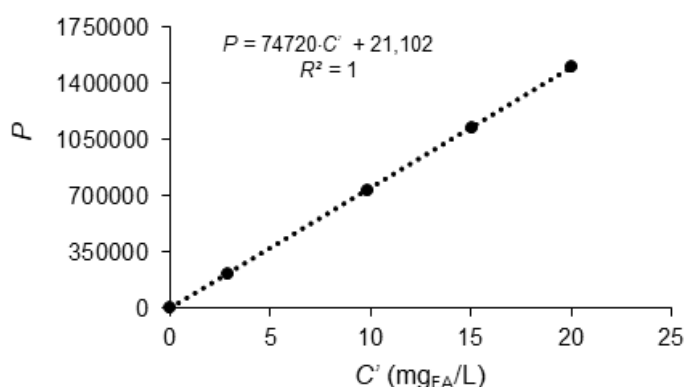
Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih fenolnih spojeva u tekućim ekstraktima tropa grožđa provedena je reverzno-faznom UHPLC metodom pomoću detektora s nizom fotodioda (engl. *Photodiode Array Detector*, PDA) prema metodi koju su objavili autori Bucić-Kojić i sur. (2017). PDA detekcija fenolnih spojeva provedena je snimanjem spektra u području valnih duljina između 252 i 370 nm, a njihovo razdvajanje korištenjem Kinetex® C18 kolone (100  $\times$  4,6) mm, 2,6  $\mu$ m, Phenomenex, Torrance, CA, SAD). Uzorci su filtrirani kroz membranske filtere veličine pora od 0,45  $\mu$ m (Chromafil Xtra PTFE, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Njemačka). Razdvajanje spojeva je provedeno linearnom gradijentnom metodom uz primjenu dva otapala: otapalo A (1 % octena kiselina u vodi, v/v) i otapalo B (50 % metanol, 50 % acetonitril, v/v); pri 30 °C, s protokom od 1 mL/min od 5 % do 30 % B 25 minuta, od 30 % do 40 % B 10 minuta, od 40 % do 48 % B 5 minuta, od 48 % do 70 % B 10 minuta, od 70 % do 100 % B 5 minuta, zatim izokratno 100 % B tijekom 5 minuta, nakon čega slijedi povratak na početne uvjete (10 minuta) i ekvibracija kolone (12 minuta). Volumen injektiranja uzoraka je bio 20  $\mu$ L. Podatci su obrađeni pomoću softvera LabSolutions 5.87. Pojedinačni fenolni spojevi su identificirani usporedbom njihovih retencijskih vremena i UV-Vis spektra s onima

autentičnih standarda analiziranih pri istim kromatografskim uvjetima. Kvantifikacija je provedena primjenom metode vanjskog standarda. Primjer kalibracijske krivulje prikazan je na **Slici 3.3**. Hidroksibenzojeve kiseline su detektirane na 252 – 280 nm, hidroksicimetne kiseline na 276 – 277 nm, flavan-3-oli na 273 – 277 nm, flavonoli na 365 – 370 nm, procijanidini na 278 nm i stilbeni na 305 – 323 nm. Masene koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima ( $C'$ , mg/L) preračunate su na masu suhe tvari tropa grožđa ( $C$ , mg/g<sub>s.t.</sub>) prema izrazu (3.1):

$$C = \frac{C' \cdot V \cdot DF}{m_{uz.} \cdot \frac{w_{s.t.}}{100}} \quad (3.1)$$

gdje je:  $V$  – ukupni volumen ekstrakta tropa grožđa (L),  $DF$  – faktor razrjeđenja,  $m_{uz.}$  – masa tropa grožđa (g),  $w_{s.t.}$  – udio suhe tvari tropa grožđa (%).

Analiza fenolnih spojeva u ekstraktima je provedena u tri paralelna ponavljanja, a vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.



**Slika 3.3.** Primjer kalibracijske krivulje za određivanje elaginske kiseline (engl. *Ellagic Acid*, EA) UHPLC metodom. Graf prikazuje ovisnost površine ispod pika ( $P$ ) o koncentraciji elaginske kiseline ( $C'$ , mg<sub>EA</sub>/L)

### **Određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa**

Ukupni fenolni spojevi (UF) u ekstraktima tropa grožđa određeni su spektrofotometrijski mikro Folin-Ciocalteuovom metodom (Waterhouse, 2001).

#### *Princip*

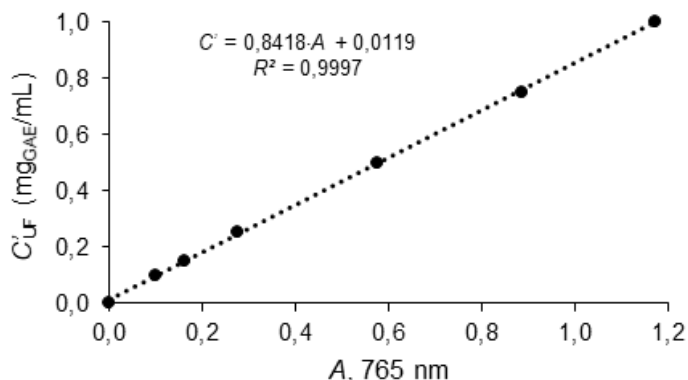
Folin-Ciocalteu metoda je kolorimetrijska metoda koja se temelji na oksidacijskim i redukcijским reakcijama. U alkalnom mediju u prisustvu Folin-Ciocalteu reagensa (smjesa



fosfowolframove i fosfomolibden kiseline) fenolni spojevi se oksidiraju, a navedene kiseline reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni te se njihova apsorbanacija mjeri pri valnoj duljini od 765 nm (Stratil et al., 2006).

#### Postupak

U epruvete je otpipetirano 40  $\mu\text{L}$  pripremljenog ekstrakta tropa grožđa, 3160  $\mu\text{L}$  destilirane vode i 200  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa te je nakon stajanja 30 sekundi i 8 minuta u svaku epruvetu dodano 600  $\mu\text{L}$  20%-tne vodene otopine natrijevog karbonata. Slijepa proba pripremljena je na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodavao jednaki volumen (40  $\mu\text{L}$ ) destilirane vode. Svi uzorci su protreseni na vorteksu i ostavljeni u vodenoj kupelji 30 minuta pri 40 °C da se razvije boja čija je apsorbanacija mjerena na UV/VIS spektrofotometru pri valnoj duljini od 765 nm. Iz dobivenih apsorbanacija preko kalibracijske krivulje (**Slika 3.4.**) izračunate su koncentracije UF i izražene u ekvivalentima galne kiseline (engl. *Gallic Acid Equivalents*, GAE) koja je korištena kao standard ( $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{mL}$  ekstrakta). Zbog lakše usporedbe dobivenih rezultata, konačne koncentracije UF preračunate su na suhu tvar uzorka ( $C_{\text{UF}}$ ,  $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ) uzimajući u obzir razrjeđenje ekstrakta. Određivanje UF provedeno je u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ponavljanja  $\pm$  SD.



**Slika 3.4.** Primjer kalibracijske krivulje za određivanje koncentracije ukupnih fenolnih spojeva ( $C'_{\text{UF}}$ ) u ovisnosti o apsorbanciji ( $A$ ) prema mikro Folin-Ciocalteu metodi (galna kiselina je korištena kao standard)

#### Određivanje koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima tropa grožđa

Određivanje ukupnih flavonoida (UFL) u ekstraktima tropa grožđa provedeno je spektrofotometrijskom metodom uz pomoć aluminijevog klorida (Marinova et al., 2005).

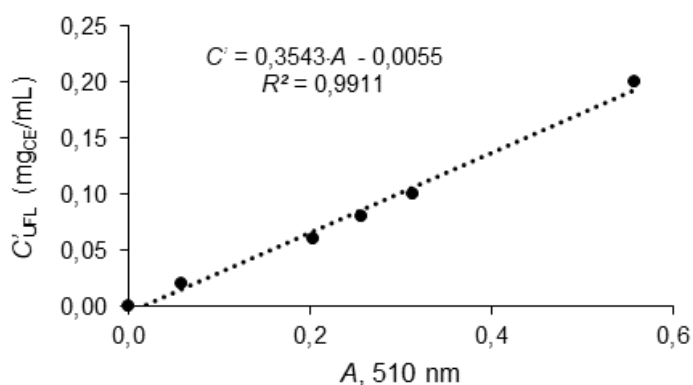
#### Princip

Ova metoda se temelji na kemijskoj reakciji stvaranja stabilnih aluminij - flavonoidnih kompleksa s C-4 keto i C-3 ili C-5 hidroksidnim skupinama flavona i flavanola. Vežanje

aluminija na flavonoidne ligande (kelatni reagens) dovodi do stvaranja obojenih kompleksa, čija se apsorbancija mjeri spektrofotometrom na valnoj duljini od 510 nm (Miletić, 2017).

#### Postupak

U 2 mL destilirane vode dodano je 0,5 mL ekstrakta, a potom 0,15 mL 5 % (w/v) natrijevog nitrita te je nakon pet minuta dodano 0,15 mL 10 %-tne vodene otopine aluminijevog klorida (otopiti 10 g u 100 mL) ili 10 %-tne vodene otopine aluminijevog klorida heksahidrata. Nakon 6 minuta dodano je 1 mL 1 M natrijevog hidroksida te je reakcijska smjesa nadopunjena s 1,2 mL destilirane vode kako bi ukupni volumen bio 5 mL. Slijepa proba pripremana je na isti način, ali se umjesto ekstrakta dodavao jednak volumen (0,5 mL) destilirane vode. Svi uzorci su protreseni na vorteksu te je odmah izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm. Iz dobivenih apsorbancija preko kalibracijske krivulje (**Slika 3.5.**) izračunate su koncentracije UFL i izražene u ekvivalentima (+)-katehina (engl. *Catechin Equivalents*, CE) koji je korišten kao standard. Masena koncentracija flavonoida ( $C'_{UFL}$ , mg<sub>CE</sub>/mL) je preračunata na suhu tvar uzorka ( $C_{UFL}$ , mg<sub>CE</sub>/g<sub>st.</sub>). Mjerenja su provedena u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ponavljanja  $\pm$  SD.



**Slika 3.5.** Primjer kalibracijske krivulje za određivanje ukupnih flavonoida ( $C'_{UFL}$ ) u ovisnosti o apsorbanciji (A) prema aluminij-klorid spektrofotometrijskoj metodi ((+)-katehin je korišten kao standard)

#### **Određivanje koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima tropa grožđa**

Ukupni ekstraktibilni proantocijanidini (UPA) u ekstraktima tropa grožđa određeni su spektrofotometrijskom metodom baziranoj na njihovoj reakciji s otopinom kiselina-butanol (Avallone et al., 1997; Škerget et al., 2005) uz određene modifikacije koje su niže opisane u postupku metode.

*Princip*

U kiselom mediju proantocijanidini se depolimeriziraju u butanolu uz nastajanje crveno obojenih antocijanidina koji se mogu detektirati spektrofotometrijski (Schofield et al., 2001). Prinos i reproducibilnost ove reakcije ovisi o udjelu kiseline i vode, temperaturi i reakcijskom vremenu te o prisustvu prijelaznih metala, kao i o stupnju polimerizacije proantocijanidina. Željezo i ioni željeza pokazali su se kao najučinkovitiji katalizatori u reakcijama nastajanja antocijanidina iz proantocijanidina (Naczki i Shahidi, 2004).

*Postupak*

U 500  $\mu\text{L}$  pripremljenog ekstrakta dodano je 5 mL otopine željezo(II)-sulfatheptahidrata (pripremljena je otapanjem 77 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  u 500 mL otopine kloridne kiseline : 1-butanol pomiješane u omjeru 2 : 3). Slijepa proba pripremljena je na isti način kao i uzorci, ali je umjesto uzorka dodan jednak volumen (500  $\mu\text{L}$ ) destilirane vode. Nakon inkubacije uzoraka 15 minuta pri 95 °C u vodenoj kupelji uzorci su naglo ohlađeni i odmah analizirani mjerenjem apsorbancije ( $A$ ) na valnoj duljini od 540 nm. Za svaki uzorak rađena su dva paralelna ponavljanja. Iz očitanih apsorbancija ( $A$ ), masena koncentracija ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina ( $C'_{\text{UPA}}$ , g/L) izračunata je pomoću molarne mase cijanidina ( $M = 287$  g/mol) i koeficijenta molarne ekstinkcije cijanidina ( $\epsilon = 34700$  L/mol·cm) prema sljedećem izrazu (3.2):

$$C'_{\text{UPA}} = \frac{A \cdot M \cdot DF}{\epsilon \cdot l} \quad (3.2)$$

gdje je:  $A$  – apsorbancija,  $DF$  – faktor razrjeđenja ( $DF = 11$ ; omjer ukupnog volumena reakcijske smjese za određivanje UPA (5500  $\mu\text{L}$ ) i volumena ekstrakta (500  $\mu\text{L}$ )),  $l$  – duljina optičkog puta (1 cm).

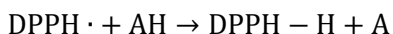
Konačne koncentracije ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina u ekstraktima preračunate su na suhu tvar tropa grožđa ( $C_{\text{UPA}}$ , mg/g<sub>s.t.</sub>) uzimajući u obzir razrjeđenje ekstrakta.

**Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata tropa grožđa DPPH metodom**

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata tropa grožđa određena je spektrofotometrijski DPPH metodom koja se smatra jednom od jednostavnijih i bržih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Prednost ove metode je i stabilnost sintetičkog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH·) radikala što je posljedica delokalizacije slobodnog elektrona preko cijele molekule, pri čemu molekula ne dimerizira, za razliku od većine drugih slobodnih radikala (Bucić-Kojić, 2008).

*Princip*

DPPH metoda je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na redukciji sintetičkog DPPH·radikala 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·) (Benvenuti et al., 2006), kako slijedi:



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 žutoj. Količina inhibiranog DPPH· radikala dokazuje veću ili manju antioksidacijsku aktivnost ispitivanog uzorka.

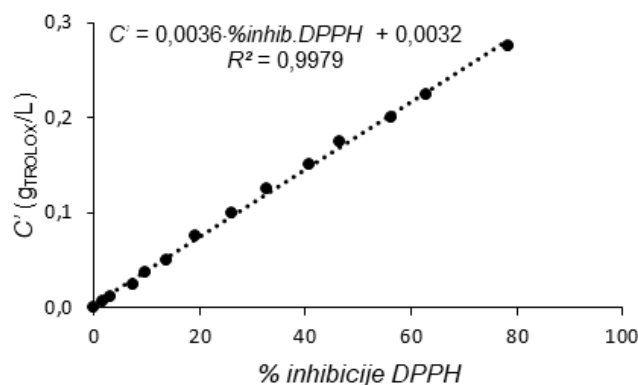
*Postupak*

U 0,1 mL alikvota ekstrakta tropa grožđa dodano je 3,9 mL otopine DPPH·u 96 %-tnom etanolu (0,026 mg<sub>DPPH</sub>./mL). Reakcijska otopina ostavljena je na sobnoj temperaturi i tamnom mjestu 30 minuta, nakon čega joj je spektrofotometrijski određena apsorbancija ( $A_{\text{ekst.}}$ ) pri valnoj duljini od 515 nm u odnosu na slijepu probu (96 % etanol). Otopina DPPH· korištena za određivanje antioksidacijske aktivnosti pripremana je uvijek svježa neposredno prije provođenja analiza te je upotrijebljena unutar 24 sata (između mjerenja čuvala se na +4 °C zaštićena aluminijskom folijom), a njezina apsorbancija ( $A_{\text{DPPH}}$ ) očitavala se pri istim uvjetima kao i u uzorcima u odnosu na slijepu probu. Inhibicija DPPH·uslijed antioksidacijske aktivnosti ispitivanih ekstrakata izračunata je u postotku (%) prema izrazu (3.3) (Benvenuti et al., 2006), kako slijedi:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = \left[ \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{ekst.}}}{A_{\text{DPPH}}} \right] \cdot 100 \quad (3.3)$$

Postotak (%) inhibiranog DPPH·radikala je uvršten u jednadžbu pravca dobivenu iz kalibracijske krivulje (**Slika 3.6.**) pripremljene s troloxom kao standardom te su rezultati izraženi u ekvivalentima troloxa ( $C'$ , g<sub>TROLOX</sub>/L). Međutim, zbog bolje usporedivosti rezultata i s obzirom na to da se za kompleksne sustave kao što su biljni ekstrakti preporučuje da se rezultati izraze po masi materijala, rezultati su preračunati na masu suhe tvari tropa grožđa ( $C$ , mg<sub>TROLOX</sub>/g<sub>s.t.</sub>) prema izrazu (3.1).

Za svaki ekstrakt antioksidacijska aktivnost je određena u tri paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ponavljanja ± SD.



**Slika 3.6.** Primjer kalibracijske krivulje za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata tropa grožđa DPPH metodom (trolox je korišten kao standard)

### **Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata tropa grožđa FRAP metodom**

#### *Princip*

FRAP metoda se temelji na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$  iona u  $\text{Fe}^{2+}$  iona u prisutnosti antioksidansa. Nastali  $\text{Fe}^{2+}$  ion u prisutnosti TPZT (2,4,6-tripiridil-s-triazin) reagensa formira intenzivno plavo obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorpcije pri 592 nm. Brzina te reakcije ovisi o redukcionalnoj snazi i koncentraciji dodanog antioksidansa (Jolić, 2017; Benzie i Strain, 1996).

#### *Priprema reagensa*

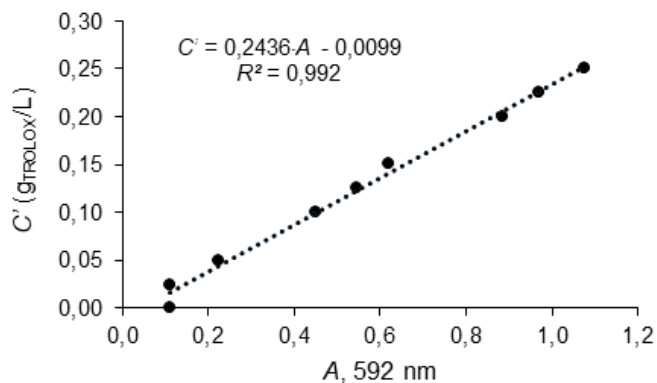
- acetatni pufer pH 3,6 (300 mM) pripremljen je miješanjem 3,1 g natrijevog acetata i 16 mL ledene octene kiseline s destiliranom vodom u odmjerenoj tikvici do volumena 1L
- klorovodična kiselina (40 mM) pripremljena je dodavanjem 3,285 mL 37 % (w/v) klorovodične kiseline u 250 mL destilirane vode te nadopunjavanjem do oznake u odmjerenoj tikvici od 1 L
- otopina TPTZ (10 mM) pripremljena je otapanjem 159,4 mg TPTZ u 50 mL otopine klorovodične kiseline (40 mM)
- otopina željezo(III)klorid heksahidrata (20 mM) pripremljena je otapanjem 551,6 mg željezo(III)klorid heksahidrata u 100 mL destilirane vode
- FRAP reagens pripremljen je miješanjem 25 mL 300 mM acetatnog pufera zagrijanog na 37°C s 2,5 ml 10 mM otopine TPTZ reagensa i 2,7 mL 20 mM otopine željezo(III)klorid heksahidrata.

#### *Postupak*

Slijepa proba je pripremana miješanjem 2,7 mL FRAP reagensa i 420  $\mu\text{L}$  destilirane vode, promiješana te je očitana apsorbancija na 592 nm nakon 40 minuta inkubacije na tamnom

mjestu pri 37 °C. Uzorci su pripremljeni miješanjem 2,7 mL FRAP reagensa, 270 µL destilirane vode i 150 µL ekstrakta, promiješani te je očitana apsorbancija nakon 40 minuta inkubacije na tamnom mjestu i 37 °C pri 592 nm. Rezultati su izraženi u ekvivalentima troloxa koji je korišten kao standard ( $C'$ , g<sub>TROLOX</sub>/L) preko kalibracijske krivulje (**Slika 3.7.**) te su preračunati na suhu tvar uzorka ( $C$ , mg<sub>TROLOX</sub>/g<sub>s.t.</sub>) prema jednadžbi (3.1).

Mjerenja su provedena u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ponavljanja ± SD.



**Slika 3.7.** Primjer kalibracijske krivulje za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata tropla grožđa FRAP metodom (trolox je korišten kao standard)

### **Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata tropla grožđa ABTS metodom**

#### *Princip*

ABTS metoda ili TEAC metoda (engl. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) se temelji na sposobnosti antioksidanasa (npr. ekstrakta bogatog fenolnim spojevima) da reduciraju (tzv. hvatanje radikala) ABTS•+ radikalski kation što se očituje u smanjenju plavo zelene boje radikal kationa pri mjerenju apsorbancije na 734 nm. Brzina obezbojenja (ABTS•+) otopine ovisi o antioksidacijskoj aktivnosti uzorka, koncentraciji antioksidanasa i trajanju reakcije. Stupanj obezbojenja otopine ABTS•+ radikalskog kationa u korelaciji je s koncentracijom antioksidanasa u uzorku i izračunat je u odnosu na reaktivnost troloxa kao standarda. Promjena, odnosno gubitak boje mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini 734 nm (Re et al., 1999).

#### *Priprema reagensa*

- temeljna otopina ABTS-a (7 mM) pripremljena je otapanjem 96,02 mg 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeve (ABTS) soli u 25 mL destilirane vode ili u fosfatnom puferu pH = 7,4 u odmjerenoj tikvici

- temeljna otopina amonij persulfata (2,45 mM) pripravljena je otapanjem 4,9 mg amonijevog persulfata u 25 mL destilirane vode (u odmjerenoj tikvici).

ABTS•+ radikalski kation nastaje oksidacijom ABTS soli pomoću jakih oksidanasa (kalijev premanganat, kalijev persulfat ili amonijev persulfat) što se očituje u promjeni boje iz bezbojne u plavo-zelenu boju otopine (Shalaby, 2013). Otopine ABTS-a i amonijevog persulfata pomiješane su u jednakim omjerima (npr. 3 mL temeljne otopine ABTS i 3 mL temeljne otopine amonijevog persulfata) pri čemu trenutno nastaje ABTS•+ radikal što se očituje nastankom zeleno-plavog obojenja. Budući da ABTS i amonijev persulfat reagiraju stehiometrijski u omjeru 1 : 0,5, to će rezultirati nepotpunom oksidacijom ABTS. Oksidacija ABTS-a započinje odmah, ali apsorbancija nije maksimalna i stabilna sve dok nije prošlo više od 6 sati. Reakcija je završena tek nakon više od 6 sati. Zbog toga se otopina ABTS•+ radikalskog kationa ostavlja u mraku pri sobnoj temperaturi 12 do 16 sati prije uporabe. Na dan analize otopina se razrjeđuje s etanolom ili destiliranom vodom (1 mL otopine ABTS•+ radikala i 60 mL etanola ili vode) tako da apsorbancija te otopine iznosi oko 0,706 pri valnoj duljini 734 nm.

#### *Postupak*

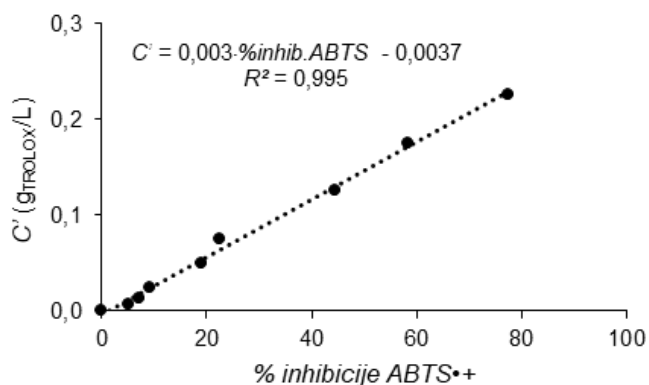
U 50 µL ekstrakata dodano je 950 µL razrijeđene otopine ABTS•+ radikala. Apsorbancija je izmjerena pri 734 nm nakon 10 minuta inkubacije na tamnom mjestu. Kontrolni uzorak pripremljen je na isti način, ali je umjesto uzorka korišten etanol. Kao slijepa proba korišten je apsolutni etanol. Inhibicija (%) ABTS•+ radikala izračunata je prema izrazu (3.4):

$$\% \text{ inhibicije ABTS} = \left[ \frac{A_K - A_{UZ}}{A_K} \right] \times 100 \quad (3.4)$$

gdje je:  $A_K$  – apsorbancija kontrolnog uzorka i  $A_{UZ}$  – apsorbancija uzorka (ekstrakta).

Zbog bolje usporedivosti rezultata postotak inhibiranog ABTS•+ radikala preračunat je u ekvivalente troloxa ( $C'$ , g<sub>TROLOX</sub>/L) preko kalibracijske krivulje (**Slika 3.8.**) i zatim izražen u ekvivalentima troloxa po masi suhe tvari tropa grožđa ( $C$ , mg<sub>TROLOX</sub>/g<sub>s.t.</sub>) prema izrazu (3.1).

Mjerenja su provedena u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ponavljanja ± SD.



**Slika 3.8.** Primjer kalibracijske krivulje za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata tropa grožđa ABTS metodom (trolox je korišten kao standard)

### 3.3.4. Analiza šećera u ekstraktima tropa grožđa

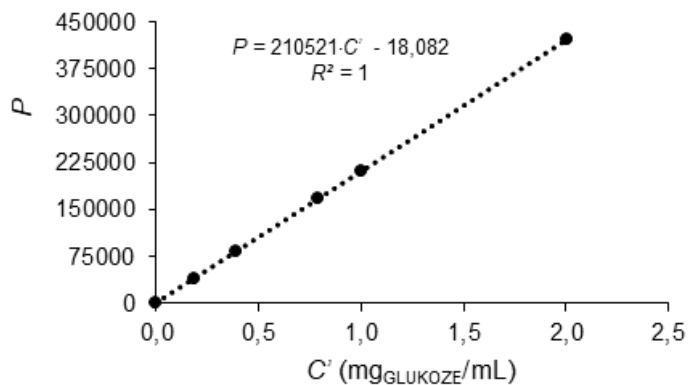
#### **Priprema ekstrakata tropa grožđa za analizu šećera**

Jedan gram samljevenog i osušenog tropa grožđa ekstrahiran je s 25 mL destilirane vode u zatvorenim tikvicama. Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji s tresilicom pri ranije utvrđenim optimalnim uvjetima ( $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $n = 170\text{ rpm}$ ,  $t = 30\text{ min}$ ) u tri paralele (Šibalić, 2016). Nakon ekstrakcije, suspenzija je centrifugirana pri  $10000 \times g$  tijekom 10 minuta, a supernatant/ekstrakt je korišten za određivanje koncentracije pojedinačnih šećera i reducirajućih šećera.

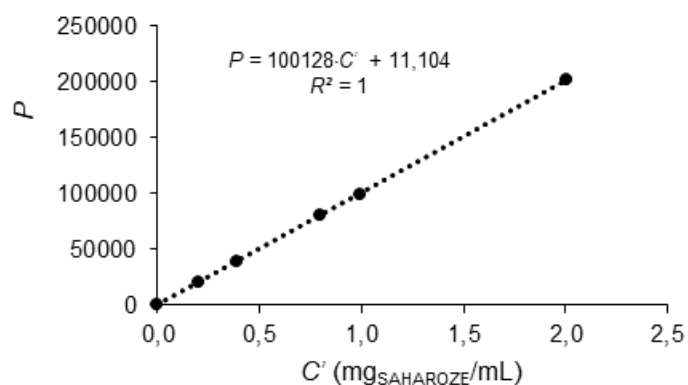
#### **Određivanje koncentracije pojedinačnih šećera u ekstraktima tropa grožđa**

Udio pojedinačnih šećera (saharoza, glukoza, fruktoza, arabinoza, ksiloza) analiziran je UHPLC-om pomoću detektora indeksa loma (engl. *Refractive Index Detector*, RID) prema metodama dobivenim uz kolone. Udio saharoze određen je pomoću Aminex® HPX kolone (HPX 87H, (300 × 7,8) mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) s mobilnom fazom 5 mM sumpornom kiselinom, protokom od 0,6 mL/min, pri 40 °C, tijekom 60 min. Udio glukoze, fruktoze, arabinoze i ksiloze određen je pomoću Nucleogel® Sugar Pb kolone (VA, (300 × 7,8) mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Njemačka) s ultračistom vodom kao mobilnom fazom, protokom od 0,4 mL/min, pri 80 °C, tijekom 20 min. Podaci su analizirani pomoću softvera LabSolutions (verzija 5.87). Šećeri u ekstraktima su identificirani usporedbom retencijskog vremena i spektralnih podataka s autentičnim standardima. **Slika 3.9.** prikazuje primjer kalibracijske krivulje za glukožu čija je koncentracija određena pomoću Nucleogel® Sugar Pb kolone, a **Slika 3.10.** primjer kalibracijske krivulje za saharozu čija je koncentracija određena pomoću Aminex® HPX kolone.





**Slika 3.9.** Kalibracijska krivulja za određivanje koncentracije glukoze UHPLC metodom pomoću Nucleogel® Sugar Pb kolone



**Slika 3.10.** Kalibracijska krivulja za određivanje koncentracije saharoze UHPLC metodom pomoću Aminex® HPX kolone

Rezultati su izraženi u  $\text{mg}/\text{mL}$  te su preračunati na masu suhe tvari uzorka ( $\text{mg}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ) prema izrazu (3.1). Mjerenja su provedena u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ponavljanja  $\pm$  SD.

### **Određivanje koncentracije reducirajućih šećera DNS metodom**

Koncentracija reducirajućih šećera određena je spektrofotometrijski prema DNS metodi (Alarcón et al., 2021; Miller, 1959).

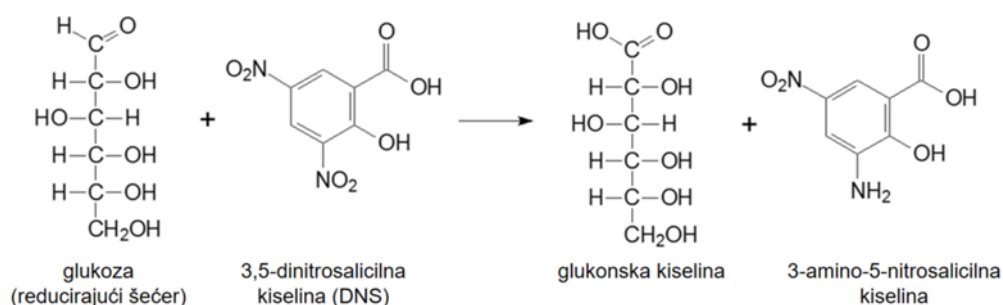
#### *Priprema DNS reagensa*

DNS (3,5-dinitrosalicilne kiselina) reagens je pripremljen otapanjem 2,18 g DNS-a u 80 mL 0,5 M natrijevog hidroksida uz zagrijavanje i miješanje pri  $70^\circ\text{C}$ . Nakon otapanja dodano je 30 g natrijevog kalijevog tartarata i miješano do njegovog potpunog otapanja. Otopina je ohlađena

na sobnu temperaturu te je nadopunjena destiliranom vodom do oznake u odmjernoj tikvici od 100 mL (Daud et al., 2019).

### Princip

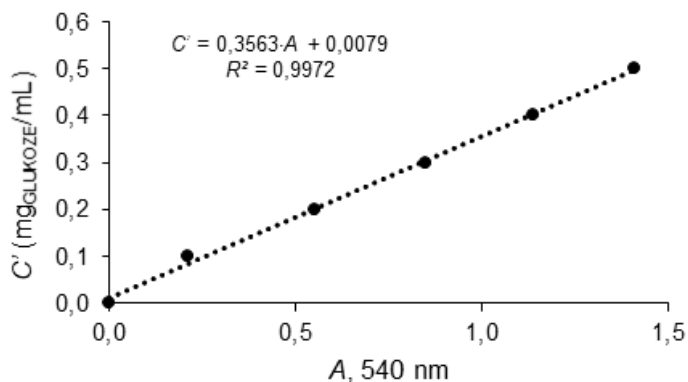
Metoda se temelji na detekciji prisutnosti slobodne karbonilne C=O skupine reducirajućih šećera. Osnovni princip metode je reakcija aromatske 3,5-dinitrosalicilne kiseline s karbonilnim krajevima reducirajućih šećera pri čemu nastaje 3-amino-5-nitrosalicilna kiselina (**Slika 3.11.**) tamnonarančaste boje s maksimalnom apsorbancijom pri 540 nm (de Borba et al., 2022; Visvanathan et al., 2020).



**Slika 3.11.** Redox reakcija između DNS-a i reducirajućeg šećera (Applegate et al., 2019)

### Postupak

U epruvete s čepom dodano je 500  $\mu\text{L}$  ekstrakta tropa grožđa (pripremljenog prema protokolu navedenom u potpoglavlju „*Određivanje koncentracije reducirajućih šećera DNS metodom*“ te 500  $\mu\text{L}$  DNS reagensa. Slijepa proba priređena je na isti način samo je umjesto ekstrakta dodano 500  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Nakon dodavanja DNS reagensa uzorci su inkubirani 5 minuta pri 100  $^{\circ}\text{C}$  te su ohlađeni na sobnu temperaturu tako da je dno epruveta bilo uronjeno u hladnu vodu tijekom 10 minuta. Nakon hlađenja uzoraka, izmjerena je apsorbancija uzorka u odnosu na slijepu probu pri 540 nm. Koncentracija reducirajućih šećera ( $C'$ ,  $\text{mg}_{\text{GLUKOZE}}/\text{mL}$ ) izračunata je preko kalibracijske krivulje napravljene s glukozom kao standardom (**Slika 3.12.**) uzimajući u obzir razrjeđenja uzoraka te su rezultati preračunati na masu suhe tvari uzorka ( $C$ ,  $\text{mg}_{\text{GLUKOZE}}/\text{g}_{\text{s.t.}}$ ) prema izrazu (3.1). Mjerenja su provedena u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ponavljanja  $\pm$  SD.



**Slika 3.12.** Kalibracijska krivulja za određivanje koncentracije reducirajućih šećera ( $C'$ ) u ovisnosti o apsorbanciji ( $A$ ) prema DNS metodi

### 3.3.5. Određvanje pH vrijednosti, aktivnosti enzima i koncentracije proteina u ekstraktima tropa grožđa

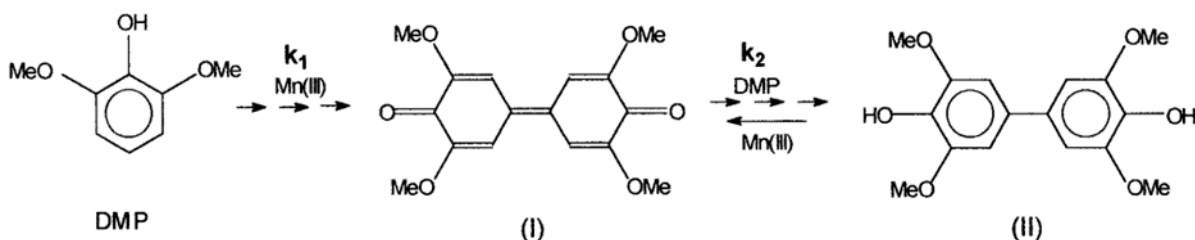
#### ***Priprema ekstrakata tropa grožđa za mjerenje pH vrijednosti, aktivnosti enzima i koncentracije proteina***

Nakon 1. – 5., 10. i 15. dana biološke obrade iz laboratorijskih staklenki i bioreaktora s pliticama uzimani su uzorci za pripremu ekstrakata za mjerenje aktivnosti lignolitičkih i hidrolitičkih enzima. Ekstrakcija je provedena na način da je u 2 g uzorka dodano 10 mL odgovarajućeg pufera (50 mM natrij malonatni pufer pH 4,5 za pripremu ekstrakata za mjerenje aktivnosti lakaze i mangan peroksidaze, 50 mM natrij tartaratni pufer pH 3,0 za pripremu ekstrakata za mjerenje aktivnosti lignin peroksidaze; 0,1 M natrij acetatni pufer pH 5,0 za pripremu ekstrakata za mjerenje aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze; 50 mM natrij citratni pufer pH 5,3 za pripremu ekstrakata za mjerenje aktivnosti ksilanaze; 0,1 M natrij acetatni pufer pH 4,5 za pripremu ekstrakata za mjerenje aktivnosti invertaze i 50 mM natrij citratni pufer pH 4,8 za pripremu ekstrakata za mjerenje aktivnosti celulaze), nakon čega su uzorci miješani na vorteksu svakih 5 minuta u intervalima od 15 sekundi (ukupno 30 minuta) i centrifugirani pri  $10000 \times g$  tijekom 5 minuta. Odvojeni supernatant korišten je kao sirovi enzimski koktel za mjerenje aktivnosti lignolitičkih enzima (lakaze, mangan peroksidaze i lignin peroksidaze) i hidrolitičkih enzima ( $\beta$ -glukozidaze, ksilanaze, celulaze i invertaze). U pripremljenim ekstraktima izmjerena je i koncentracija proteina, a za mjerenje pH-vrijednosti 2 g uzorka ekstrahirano je s destiliranom vodom, prema istom protokolu.

## Mjerenje aktivnosti lakaze i mangan peroksidaze

### Princip

Testovi za mjerenje aktivnosti mangan peroksidaze (MnP) i lakaze provedeni su prema metodi autora Lueangjaroenkit i sur. (2020). Aktivnosti MnP i lakaze određene su praćenjem oksidacije supstrata 2,6-dimetoksifenola (DMP) pri 469 nm tijekom 120 sekundi. Supstrat DMP je otopljen u 50 mM natrij malonatnom puferu pH 4,5. Manganov sulfat se dodaje kao induktor pri čemu enzim katalizira oksidaciju  $Mn^{2+}$  u  $Mn^{3+}$ . Vodikov peroksid (0,6 mM) pokreće reakciju u kojoj zajedno s  $Mn^{3+}$  oksidira DMP te nastaje narančasto smeđi dimer (2,2',6,6'-tetrametoksidibenzo-1,1'-dikinon). Sve dok je enzim prisutan u reakcijskoj smjesi konstantno nastaje  $Mn^{3+}$ , a dok ima vodikovog peroksida nastaje produkt, odnosno kinon koji konstantno prelazi iz oksidiranog (2,2',6,6'-tetrametoksidibenzo-1,1'-dikinon) u reducirani oblik (3,3',5,5'-tetrametoksi-4,4'-dihidroksibifenil) (Slika 3.13.). Reakcija završava kada se potroši sav vodikov peroksid te dođe do obezbojenja reakcijske smjese.



**Slika 3.13.** Reakcijska shema oksidacije DMP-a. Narančasto smeđi kinon (I) (2,2',6,6'-tetrametoksidibenzo-1,1'-dikinon) je obezbojen u komponentu (II) (3,3',5,5'-tetrametoksi-4,4'-dihidroksibifenil) (Grgič et al., 2001)

### Postupak

Kod testa za mjerenje aktivnosti lakaze reakcijska smjesa se sastojala od 800  $\mu$ L natrij malonatnog pufera (50 mM, pH 4,5), 100  $\mu$ L DMP-a (1 mM) i 100  $\mu$ L ekstrakta koji sadrži enzim. Dobivene promjene apsorbancije u vremenu korištene su za izračunavanje aktivnosti lakaze prema izrazu (3.5):

$$V.A. = \frac{V_R}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{dA}{dt} \quad (3.5)$$

gdje je:  $V_R$  – ukupni volumen reakcijske smjese (mL),  $V_E$  – volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (mL),  $\varepsilon$  – ekstinkcijski koeficijent ( $\varepsilon_{469} = 0,0496 \text{ L}/\mu\text{mol cm}$ ),  $d$  – promjer kivete ( $d = 1 \text{ cm}$ ),  $dA/dt$  – promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca) (1/min),  $V.A.$  – volumna aktivnost enzima (U/L), pri čemu 1 U predstavlja jedinicu volumne aktivnosti, odnosno onu aktivnost enzima koja je potrebna da se oksidira 1  $\mu$ mol supstrata u minuti.

Specifična aktivnost lakaze izračunata je prema jednadžbi (3.6):

$$S.A. = \frac{V.A.}{C_P} \quad (3.6)$$

gdje je: S.A. – specifična aktivnost enzima (U/mg), V.A. – volumna aktivnost enzima (U/mL) i  $C_P$  – masena koncentracija proteina (mg/mL).

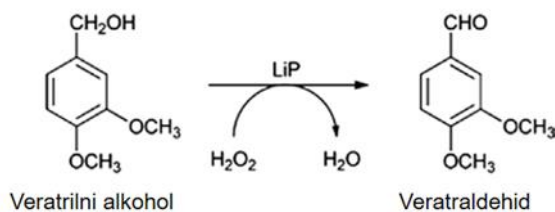
Za mjerenje ukupne aktivnosti enzima (aktivnost lakaze + aktivnost MnP) reakcijska smjesa se sastojala od 640  $\mu$ L natrij malonatnog pufera (50 mM, pH 4,5), 100  $\mu$ L 1 mM manganovog sulfata, 100  $\mu$ L 1 mM DMP-a, 100  $\mu$ L ekstrakta koji sadrži enzime i 60  $\mu$ L 0,1 mM  $H_2O_2$ . Dobivene vrijednosti promjene apsorbancije u vremenu korištene su za izračun volumne i specifične aktivnosti koja predstavlja ukupnu aktivnost enzima lakaze i MnP. Aktivnost MnP izračunata je iz razlike između ukupne aktivnosti enzima (aktivnost lakaze + MnP) i aktivnosti lakaze. Mjerenja su provedena u tri paralelna ponavljanja, a rezultati aktivnosti MnP i lakaze izražene su kao volumne aktivnosti preračunate na masu suhe tvari uzorka (V.A., U/g<sub>s.t.</sub>).

### Mjerenje aktivnosti lignin peroksidaze

Mjerenje aktivnosti lignin peroksidaze (LiP) provedeno je prema metodi autora (Field et al., 1996; Linko i Haapala, 1993).

#### Princip

Aktivnost LiP je mjerena spektrofotometrijski praćenjem oksidacije supstrata veratrilnog alkohola u veratraldehid (**Slika 3.14.**). Veratrilni alkohol pripremljen je dodavanjem 0,0438 g 96 % (w/v) veratrilnog alkohola u 25 mL natrij tartaratnog pufera (50 mM, pH 3,0).



**Slika 3.14.** Reakcija oksidacije veratrilnog alkohola u veratraldehid katalizirana lignin peroksidazom (Peralta et al., 2017)

#### Postupak

Reakcijska smjesa sadržavala je 860  $\mu$ L 2 mM veratrilnog alkohola otopljenog u natrij tartaratnom puferu (pH 3,0), 100  $\mu$ L ekstrakta koji sadrži enzim i 40  $\mu$ L 0,4 mM  $H_2O_2$  koji je pokretač reakcije. Promjena apsorbancije u vremenu praćena je tijekom 120 sekundi pri 310 nm i sobnoj temperaturi. Dobivene vrijednosti promjene apsorbancije u vremenu korištene su za izračun volumne i specifične aktivnosti lignin peroksidaze prema jednadžbama (3.5) i (3.6). Ekstinkcijski koeficijent za nastali produkt (veratraldehid) je 0,0093 L/ $\mu$ mol cm (Field et

al., 1996). Mjerenja su provedena u tri paralelna ponavljanja, a rezultati aktivnosti LiP izražene su kao volumne aktivnosti preračunate na masu suhe tvari uzorka ( $V.A.$ , U/g<sub>s.t.</sub>).

### **Mjerenje aktivnosti $\beta$ -glukozidaze**

Aktivnost  $\beta$ -glukozidaze mjerena je prema metodi autora Karpe i sur. (2017).

#### *Princip*

Enzimskom hidrolizom supstrata *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozida (*p*-NPG), koji je bezbojan, oslobađaju se glukoza i *p*-nitrofenol koji u prisutnosti natrijevog karbonata požuti, a njegova apsorpcija se mjeri na 400 nm.

#### *Postupak*

Supstrat 0,02 M *p*-NPG pripremljen je otapanjem u 0,1 M natrij acetatnom puferu (pH 5,0). U epruvete je otpipetirano 500  $\mu$ L 0,1 M natrij acetatnog pufera, 250  $\mu$ L supstrata (0,02 M *p*-NPG) i 250  $\mu$ L ekstrakta koji sadrži enzim. Sadržaj epruveta je promiješan na vorteksu i stavljen na inkubaciju na 50 °C tijekom 5 minuta, nakon čega je u epruvete dodan 1 mL natrijevog karbonata (0,2 M) koji služi za zaustavljanje reakcije. Sadržaj je ponovo promiješan na vorteksu te je izmjerena apsorbanacija pri 400 nm. Slijepa proba je pripremljena na isti način, samo je uzorak dodan tek nakon dodavanja 0,2 M natrijevog karbonata.

Dobivene apsorbanacije korištene su za izračun volumne i specifične aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze prema jednadžbi (3.7):

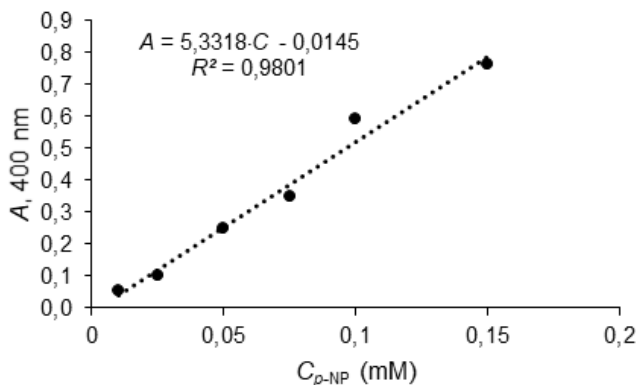
$$V.A. = \frac{(A_{UZ} - A_{SP}) \cdot V_R \cdot DF}{d \cdot t \cdot V_E \cdot \varepsilon} \quad (3.7)$$

gdje je:  $V_R$  - ukupni volumen reakcijske smjese (mL),  $DF$  - faktor razrjeđenja,  $A_{UZ}$  - apsorbanacija uzorka,  $A_{SP}$  - apsorbanacija slijepe probe,  $V_E$  - volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (mL),  $\varepsilon$  - ekstinkcijski koeficijent ( $\varepsilon_{400} = 4,9952 \text{ mL}/\mu\text{mol cm}$ ),  $d$  - promjer kivete ( $d = 1 \text{ cm}$ ),  $t$  - vrijeme trajanja reakcije (min),  $V.A.$  - volumna aktivnost enzima (U/mL).

Specifična aktivnost izračunata je prema jednadžbi (3.6.). Ekstinkcijski koeficijent ( $\varepsilon$ ) nastalog produkta (*p*-nitrofenola) ( $4,9952 \text{ mL}/\mu\text{mol cm}$ ) izračunat je preko kalibracijske krivulje prikazane na **Slici 3.15.**, pomoću izraza (3.8.):

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot l} \quad (3.8)$$

gdje je:  $A$  - apsorbanacija različitih koncentracija *p*-nitrofenola u uvjetima testa,  $c$  - koncentracija *p*-nitrofenola (mM),  $l$  - duljina optičkog puta (cm).



**Slika 3.15.** Kalibracijska krivulja s *p*-nitrofenolom (*p*-NP) za određivanje ekstinkcijskog koeficijenta

Mjerenja su provedena u tri paralelna ponavljanja, a rezultati aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze izražene su kao volumne aktivnosti preračunate na masu suhe tvari uzorka ( $V.A.$ , U/g<sub>s.t.</sub>) pri čemu jedan U predstavlja onu aktivnost enzima koja je potrebna da se oslobodi 1  $\mu$ mol *p*-nitrofenola u minuti.

### **Mjerenje aktivnosti ksilanaze**

Aktivnost ksilanaze mjerena je prema metodi autora Bailey i sur. (1992). DNS metoda za određivanje reducirajućih šećera korištena je za mjerenje aktivnosti ksilanaze na temelju oslobađanja reducirajućih šećera. Ksilozna koja se oslobađa hidrolizom ksilana kvantificirana je spektrofotometrijski pri 540 nm.

#### *Postupak*

Rekacijska smjesa sadržavala je 900  $\mu$ L 1 % w/v komercijalnog supstrata arabinoksilana pšenice (pripremljen otapanjem u 50 mM natrij citratnom puferu pH 5,3) i 100  $\mu$ L uzorka koji sadrži enzim. Slijepa proba i kontrola enzima sadržavale su 900  $\mu$ L supstrata. Sve epruvete su stavljene na inkubaciju u vodenu kupelj tijekom 5 min na 50 °C. Nakon inkubacije u sve epruvete dodano je 1500  $\mu$ L DNS reagensa (pripremljen prema protokolu navedenom u potpoglavlju „*Određivanje koncentracije reducirajućih šećera DNS metodom*“). Sadržaj epruveta promiješan je na vorteksu te je u epruvetu koja predstavlja kontrolu enzima dodano 100  $\mu$ L uzorka koji sadrži enzim, a u epruvetu koja predstavlja slijepu dodano je 100  $\mu$ L natrij citratnog pufera. Sadržaj epruveta ponovo je promiješan na vorteksu te je uslijedila inkubacija u vodenoj kupelji na 100 °C tijekom 5 minuta. Sadržaj epruveta je ohlađen na sobnu temperaturu tako da je dno epruveta bilo uronjeno u hladnu vodu tijekom minimalno 15 minuta. Nakon hlađenja uzoraka, izmjerena je njihova apsorbancija u odnosu na slijepu probu pri 540 nm. Kontrola enzima potrebna je ukoliko je faktor razrjeđenja poprilično mali i/ili ukoliko

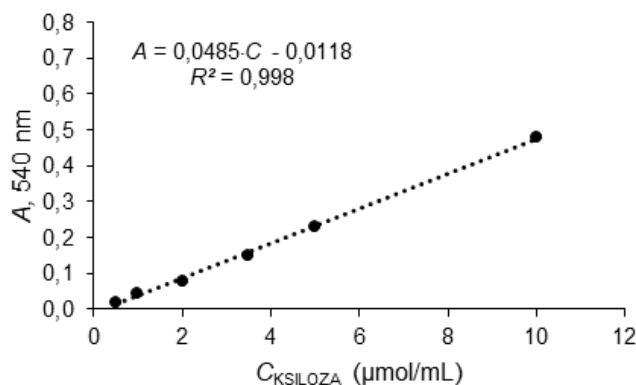
uzorak sadrži visoki udio reducirajućih šećera. Tada se apsorbancija kontrole enzima oduzima od apsorbancije uzorka prilikom izračuna aktivnosti ksilanaze. Volumna aktivnost ksilanaze je izračunata prema jednadžbi (3.9), kako sljedi:

$$V.A. = \frac{(A_{UZ} - A_{EK}) \cdot V_R \cdot DF}{d \cdot t \cdot V_E \cdot \varepsilon} \quad (3.9)$$

gdje je:  $V_R$  - ukupni volumen reakcijske smjese (mL),  $DF$  - faktor razrjeđenja,  $A_{UZ}$  - apsorbancija uzorka,  $A_{EK}$  - apsorbancija kontrole enzima,  $V_E$  - volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (mL),  $\varepsilon$  - ekstinkcijski koeficijent ( $\varepsilon_{540} = 0,0438 \text{ mL}/\mu\text{mol cm}$ ),  $d$  - promjer kivete ( $d = 1 \text{ cm}$ ),  $t$  - vrijeme trajanja reakcije (min),  $V.A.$  - volumna aktivnost (U/mL).

Ekstinkcijski koeficijent ( $\varepsilon_{540} = 0,0438 \text{ mL}/\mu\text{mol cm}$ ) nastalog produkta (ksiloze) izračunat je preko kalibracijske krivulje (Slika 3.16.) pomoću izraza (3.8), a specifična aktivnost ksilanaze izračunata je prema izrazu (3.6).

Kalibracijska krivulja sa ksilozom kao standardom napravljena je tako da je u 900  $\mu\text{L}$  supstrata (1 % w/v arabinoksilan pšenice) dodano 100  $\mu\text{L}$  pripremljenog standarda (niz otopina različitih koncentracija pripremljen u rasponu 0,5 – 10  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ). Sadržaj je promiješan na vorteksu te inkubiran 5 minuta u vodenoj kupelji na 50 °C, nakon čega je dodano 1500  $\mu\text{L}$  DNS reagensa. Zatim je slijedilo miješanje na vorteksu i inkubacija u vodenoj kupelji tijekom 5 minuta na 100 °C te hlađenje na sobnu temperaturu i mjerenje apsorbancije pri 540 nm u odnosu na slijepu probu (smjesa supstrata, DNS reagensa i natrij citratnog pufera).



**Slika 3.16.** Kalibracijska krivulja sa ksilozom kao standardom za određivanje ekstinkcijskog koeficijenta

Mjerenja su provedena u tri paralelna ponavljanja, a rezultati aktivnosti ksilanaze izražene su kao volumne aktivnosti preračunate na masu suhe tvari uzorka ( $V.A.$ , U/g<sub>s.t.</sub>) pri čemu jedan U predstavlja onu aktivnost enzima koja je potrebna da se oslobodi 1  $\mu\text{mol}$  ekvivalenta ksiloze u minuti.



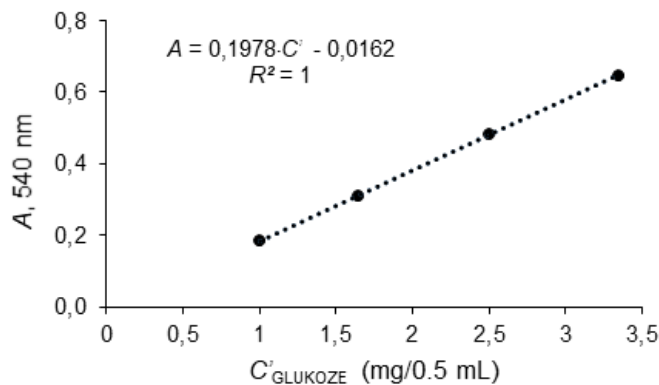
### **Mjerenje aktivnosti celulaze**

Aktivnost celulaze mjerena je prema protokolu autora Ghose (1987) i Adney i Baker (2008). DNS metoda za određivanje reducirajućih šećera korištena je za mjerenje aktivnosti celulaze na temelju cijepanja glikozidnih veza i oslobađanja glukoze, koja je kvantificirana spektrofotometrijski pri 540 nm.

Ekstrakti u kojima se ispituje aktivnost celulaze mogu u nekim slučajevima sadržavati reducirajuće šećere koji nisu povezani s hidrolizom supstratnih glikozidnih veza pomoću enzima, a reducirajući krajevi celuloznih polimera supstrata ponekad se mogu izmjeriti kao ekvivalenti glukoze prije bilo kakvog djelovanja enzima. Iz tog razloga, test za mjerenje aktivnosti celulaze uključuje kontrolu enzima i kontrolu supstrata (Adney i Baker, 2008).

#### *Postupak*

Test za mjerenje aktivnosti celulaze sastoji se od (A) smjese s uzorkom, (B) slijepa probe, (C) kontrole enzima i (D) kontrole supstrata. U staklene epruvete za mjerenje apsorbancije smjese s uzorkom (A) i kontrole supstrata (D) stavljen je zarolani filter papir (Whatman No. 1,0 x 6 cm) koji je korišten kao supstrat. U epruvete koje predstavljaju smjesu s uzorkom (A) i kontrolu enzima (C) dodano je 1 mL natrij citratnog pufera (50 mM, pH 4,8), a u epruvete koje predstavljaju slijepu probu (B) i kontrolu supstrata (D) dodano je 1,5 mL natrij citratnog pufera (50 mM, pH 4,8). Sve epruvete su kratko termostahirane na 50 °C, nakon čega je u epruvete koje predstavljaju smjesu s uzorkom (A) i kontrolu enzima (C) dodano 500 µL ekstrakta i promiješano na vorteksu. Sve epruvete su stavljene na inkubaciju na 50 °C tijekom 60 min. Nakon inkubacije, enzimska reakcija je zaustavljena dodatkom 3 mL DNS regensa (pripremljen prema protokolu navedenom u potpoglavlju „*Određivanje koncentracije reducirajućih šećera DNS metodom*“) u svaku epruvetu te su promiješane na vorteksu i stavljene na inkubaciju u vodenu kupelj s kipućom vodom na 100 °C točno 5 min, nakon čega su epruvete stavljene na hlađenje u kupelj s hladnom vodom. Nakon hlađenja, sadržaj epruveta (200 µL) razrijeđen je s destiliranom vodom (2,5 mL), promiješan te je izmjerena apsorbancija smjese s uzorkom, kontrole enzima i kontrole supstrata u odnosu na slijepu probu pri 540 nm. Apsorbancija uzorka je na kraju korigirana na kontrolu enzima i kontrolu supstrata. Koncentracija oslobođene glukoze tijekom reakcije izračunata je pomoću baždarne krivulje napravljene sa standardom glukoze poznatih koncentracija (**Slika 3.17.**).



**Slika 3.17.** Kalibracijska krivulja s glukozom kao standardom za određivanje količine oslobođene glukoze

Razrjeđenja uzoraka prilikom mjerenja potrebno je podesiti tako da koncentracija dodanog enzima otpušta točno 2 mg glukoze pri uvjetima testa, pri čemu aktivnost enzima iznosi (3.10):

$$FPU = \frac{\left(2 \text{ mg oslobođene glukoze} / 0,18016 \frac{\text{mg}}{\mu\text{mol}}\right)}{(0,5 \text{ mL uzorka} \times 60 \text{ min})} = 0,37 \mu\text{mol} / \text{min mL} \quad (3.10)$$

te se aktivnost celulaze računa prema sljedećem izrazu (3.11):

$$V.A. = \frac{0,37}{E} \quad (3.11)$$

gdje je:  $E$  – ona koncentracija enzima koja oslobađa 2 mg glukoze pri uvjetima testa (koncentracija enzima podrazumijeva mL izvorne otopine (uzorka) prisutan u svakom mL razrjeđenja) i  $V.A.$  – aktivnost enzima (U/mL).

Ukoliko se radi o niskoj aktivnosti celulaze u uzorcima te enzim ne može osloboditi 2 mg glukoze pri uvjetima testa, aktivnost celulaze se računa prema sljedećem izrazu (3.12):

$$V.A. = \frac{\left(\text{mg}_{\text{oslobođene glukoze}} / 0,18016 \frac{\text{mg}}{\mu\text{mol}}\right)}{(0,5 \text{ mL uzorka} \times 60 \text{ min})} \quad (3.12)$$

Mjerenja su provedena u tri paralelna ponavljanja, a rezultati aktivnosti celulaze izražene su kao volumne aktivnosti ( $V.A.$ , U/mL) i preračunate na masu suhe tvari uzorka ( $V.A.$ , U/g<sub>st.</sub>).

### **Mjerenje aktivnosti invertaze**

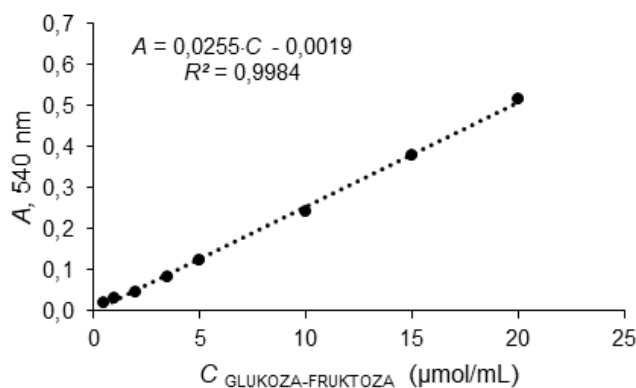
Aktivnost invertaze mjerena je prema metodi autora Margetić i Vujčić (2017). DNS metoda za određivanje reducirajućih šećera korištena je za mjerenje aktivnosti invertaze na temelju oslobađanja reducirajućih šećera. Glukoza i fruktoza koje se oslobađaju hidrolizom saharoze kvantificirani su spektrofotometrijski pri 540 nm.

#### *Postupak*

Reakcijska smjesa sadržavala je 400  $\mu\text{L}$  supstrata (0,3 M otopina saharoze pripremljena otapanjem u 0,1 M natrij acetatnom puferu, pH 4,5) i 100  $\mu\text{L}$  uzorka koji sadrži enzim. Slijepa proba i kontrola enzima sadržavale su 400  $\mu\text{L}$  supstrata. Sve epruvete su stavljene na inkubaciju u vodenu kupelj tijekom 5 min na 50 °C. Nakon inkubacije u sve epruvete dodano je 500  $\mu\text{L}$  DNS reagensa (pripremljen prema protokolu navedenom u potpoglavlju „*Određivanje koncentracije reducirajućih šećera DNS metodom*“). Sadržaj epruveta promiješan je na vorteksu te je u epruvetu koja predstavlja kontrolu enzima dodano 100  $\mu\text{L}$  uzorka koji sadrži enzim, a u epruvetu koja predstavlja slijepu dodano je 100  $\mu\text{L}$  natrij acetatnog pufera. Sadržaj epruveta ponovo je promiješan na vorteksu te je uslijedila inkubacija u vodenoj kupelji na 100 °C tijekom 5 minuta. Sadržaj epruveta je ohlađen na sobnu temperaturu te je razrijeđen dodatkom 4 mL destilirane vode, promiješan na vorteksu te je izmjerena apsorbancija u odnosu na slijepu probu pri 540 nm.

Volumna aktivnost invertaze je izračunata prema jednadžbi (3.9). Ekstinkcijski koeficijent ( $\epsilon_{540} = 0,0253 \text{ mL}/\mu\text{mol cm}$ ) nastalog produkta (glukoza, fruktoza) izračunat je preko kalibracijske krivulje pomoću izraza (3.8), a specifična aktivnost invertaze izračunata je prema izrazu (3.6).

Kalibracijska krivulja (**Slika 3.18.**) za određivanje ekstinkcijskog koeficijenta pripremljena je sa smjesom otopine glukoze i fruktoze jednakih molarnosti (0,2 M) pomiješanih u omjeru 1 : 1 kao standardom. U 400  $\mu\text{L}$  supstrata (0,3 M saharoza) dodano je 100  $\mu\text{L}$  pripremljenog standarda (niz otopina različitih koncentracija pripremljen u rasponu 0,5 – 20  $\mu\text{mol/mL}$ ). Sadržaj je promiješan na vorteksu te inkubiran 5 minuta u vodenoj kupelji na 50 °C, nakon čega je dodano 500  $\mu\text{L}$  DNS reagensa. Zatim je slijedilo miješanje na vorteksu i inkubacija u vodenoj kupelji tijekom 5 minuta na 100 °C te hlađenje na sobnu temperaturu i mjerenje apsorbancije pri 540 nm u odnosu na slijepu probu (smjesa supstrata, DNS reagensa i natrij acetatnog pufera).



**Slika 3.18.** Kalibracijska krivulja s miksom otopina glukoze i fruktoze jednakih molarnosti (0,2 M) pomiješanih u omjeru 1:1 kao standardom za određivanje ekstinkcijskog koeficijenta

Mjerenja su provedena u tri paralelna ponavljanja, a rezultati aktivnosti invertaze izražene su kao volumne aktivnosti preračunate na masu suhe tvari uzorka (V.A., U/g<sub>st.</sub>) pri čemu jedan U predstavlja onu aktivnost enzima koja je potrebna da se hidrolizira 1 μmol saharoze u minuti.

### **Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom**

Koncentracija proteina u ekstraktima tropa grožđa pripremljenim prema protokolu navedenom u poglavlju „Priprema ekstrakata tropa grožđa za mjerenje pH vrijednosti, aktivnosti enzima i koncentracije proteina“, mjerena je prema Bradfordičinoj metodi (Bradford, 1976).

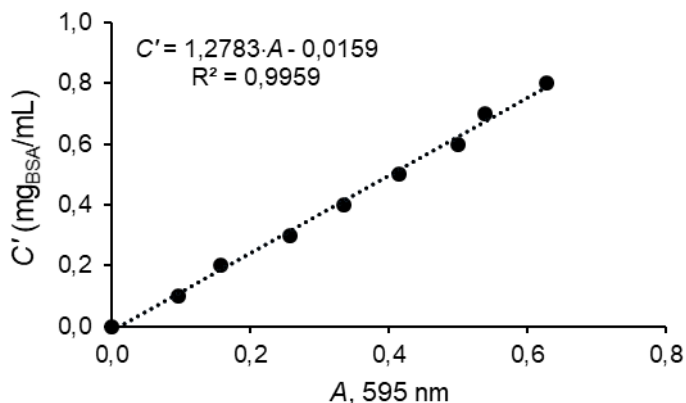
#### *Princip*

Metoda se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, uslijed čega dolazi do stvaranja kompleksa protein-boja, koji u kiselom mediju pokazuje apsorpcijski maksimum pri 595 nm (Strelec i Kovač, 2014).

#### *Postupak*

U kivete je otpipetirano 100 μL ekstrakta i dodano 2 mL svježe pripremljenog Bradfordičinog reagensa (razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1 : 4). Tako pripremljena reakcijska smjesa je ostavljena na sobnoj temperaturi 5 minuta, nakon čega je očitana apsorbanacija pri valnoj duljini 595 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba je pripremljena na isti način samo je umjesto ekstrakta u kivetu otpipetirano 100 μL destilirane vode. Uzorci su analizirani u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti. Koncentracija proteina u uzorcima (C', mg<sub>BSA</sub>/mL) određena je u odnosu na kalibracijsku krivulju (**Slika 3.19.**) koja je pripremljena s nizom otopina poznate koncentracije goveđeg serumskog albumina (engl.

*Bovine Serum Albumin*, BSA) koji je korišten kao standard. Dobiveni rezultati su korišteni za izračunavanje specifične aktivnosti enzima.



**Slika 3.19.** Primjer kalibracijske krivulje za određivanje koncentracije proteina ( $C'$ ) o apsoranciji ( $A$ ) Bradfordčinom metodom (BSA je korišten kao standard)

### 3.3.6. Analiza kemijskog sastava tropa grožđa

Analiza kemijskog sastava provedena na čvrstim uzorcima tropa grožđa prije i nakon SSF-a u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama uključivala je udio suhe tvari, pepela, proteina, masti, ukupnog ugljika (TC), anorganskog ugljika (IC), ukupnog organskog ugljika (TOC<sub>T.G.</sub>), neutralnih detergent vlakana (NDF), kiselih detergent vlakana (ADF) i kiselog detergent lignina (ADL) (lignin), hemiceluloze i celuloze, dok je u tekućim ekstraktima dobivenim prije i nakon SSF-a u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama analiziran udio pojedinačnih šećera (saharoze, glukoze, fruktoze), reducirajućih šećera, ukupnog organskog ugljika (TOC<sub>E.</sub>) i ukupnog dušika (TN). Rezultati analize kemijskog sastava tropa grožđa izraženi su na suhu tvar uzorka, a sva mjerenja provedena su u tri ponavljanja.

#### **Određivanje udjela suhe tvari u uzorcima tropa grožđa**

Udio suhe tvari određen je termogravimetrijskom metodom uz pomoć analizatora vlage na način da je uzorak postavljen na aluminijsku posudicu ( $m = 3$  g), koja je postavljena izravno na integriranu vagu u komori za sušenje, gdje je izvršeno sušenje do konstantne mase. Uvjeti sušenja su bili: standardna metoda, temperatura sušenja 105 °C i kriterij završetka procesa (engl. *switch-off* 3: gubitak težine od 1 mg u 50 s).

#### **Određivanje udjela pepela u uzorcima tropa grožđa**

Udio pepela određen je gravimetrijski potpunim izgaranjem uzorka u muflnoj peći prema metodi AACC-08-03 (AOAC, 2022a). U prethodno žarene, ohlađene i izvagane lončiče

odvagano je 2 g uzorka. Lončići s uzorcima su postavljeni u mufolnu peć pri 600 °C tijekom 4 h, nakon čega su preneseni u eksikator, ohlađeni i izvagani. Udio pepela izračunat je prema jednadžbi (3.13):

$$\% PEPEO = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad (3.13)$$

gdje je:  $m_1$  - masa praznog lončića (g),  $m_2$  - masa lončića s uzorkom (g),  $m_3$  - masa lončića nakon žarenja (g).

### **Određivanje udjela proteina u uzorcima tropa grožđa**

#### *Princip*

Udio proteina u uzorcima tropa grožđa određen je metodom po Kjeldahl-u (AOAC, 2022b) prema kojoj se udio bjelančevina u namirnicama određuje indirektno iz udjela dušika (N). Princip određivanja bjelančevina po Kjeldahl-u je zagrijavanje uzorka s koncentriranom sumpornom kiselinom uz dodatak bakrovog sulfata (katalizator) i natrijevog sulfata (sol za povišenje vrelišta) pri čemu dolazi do potpune oksidacije organske tvari, pri čemu nastali dušik, oslobođen u obliku amonijaka sa sumpornom kiselinom daje amonijev sulfat. U postupku destilacije djelovanjem lužine na amonijev sulfat oslobađa se amonijak koji se predestilira u tikvicu s kiselinom poznatog molariteta, a višak kiseline se odredi titracijom. U uzorcima također mogu biti prisutni nitrati i nitriti, međutim oni se ovom metodom ne mogu odrediti jer tijekom razaranja ishlape kao dušikovi oksidi.

#### *Postupak*

Uzorci su odvagani na listiće celofana (0,2 g ± 0,1 mg), umotani u celofan i stavljeni u staklene epruvete. Za slijepu probu u epruvetu je stavljen prazan listić celofana. Na lađice je izvagano 10 g natrijevog sulfata i 0,1 g bakrovog sulfata što je preneseno u epruvete, nakon čega je dodano 15 mL koncentrirane sumporne kiseline. Epruvete su postavljene na stalak za spaljivanje i ostavljene 30 min, zatim su lagano protrešene, spojene na sustav za odsisavanje i postavljene u blok za razaranja prethodno zagrijan na 420 °C. Razaranja je trajalo oko sat vremena te su uzorci izvađeni, ostavljeni da se ohlade i dodano je 75 mL vode, nakon čega je slijedila destilacija. Epruvete sa spaljenim uzorcima postavljene su u uređaj za destilaciju te je u njih dodano je oko 50 mL 35 % (w/v) natrijevog hidroksida nakon čega je pokrenuta destilacija te je prikupljeno oko 100 mL destilata, a kraj destilacije je potvrđen provjerom pH destilata indikator papirom. Po završetku destilacije, u tikvicu s uzorkom dodan je indikator te je titriran s 0,1 M natrijevim hidroksidom bilježeći volumen natrijevog hidroksida upotrijebljenog za titraciju. Udio dušika (N) izračunat je prema jednadžbi (3.14):

$$\% N = \frac{(a - b) \cdot f \cdot 0,14}{c \cdot 10} \quad (3.14)$$

gdje je:  $a$  - volumen 0,01 M otopine natrijevog hidroksida upotrijebljenog za titraciju slijepe probe (mL),  $b$  - volumen 0,01 M otopine natrijevog hidroksida upotrijebljenog za titraciju ispitivanog uzorka (mL),  $f$  - faktor upotrijebljenog 0,01 M natrijevog hidroksida,  $c$  - količina uzorka (g).

Udio proteina izračunat je množenjem udjela dušika (N) s faktorom 6,25.

### **Određivanje udjela ukupnog ugljika (TC), anorganskog ugljika (IC), ukupnog organskog ugljika (TOC) i ukupnog dušika (TN) u uzorcima tropa grožđa**

Udio TOC-a ( $TOC_E$ ) i TN-a određen je u ekstraktima tropa grožđa metodom katalitičke oksidacije izgaranjem pri visokoj temperaturi pomoću TOC- $L_{CPH/CPN}$  analizatora. Istom metodom, uz korištenje modula SSM-5000A, određen je i udio TC-a, IC-a i TOC-a ( $TOC_{T.G.}$ ) u čvrstim uzorcima tropa grožđa.

#### *Određivanje TC-a, IC-a i TOC-a u uzorcima tropa grožđa*

Udio TC-a i IC-a određen je metodom katalitičke oksidacije izgaranjem pri 900 °C (za TC analizu) i 200 °C (za IC analizu) (Milaković, 2016; Shimadzu Corporation, 2022). Za TC i IC analizu odvagano je oko 30 mg uzorka u prethodno žarene (550 °C, 60 min) i ohlađene keramičke lađice.

TC analiza je provedena tako da je uzorak u lađici prekriven keramičkom vunom prije uvođenja u pećnicu, a IC analiza je provedena tako da je uzorak neposredno prije početka mjerenja zakiseljen dodatkom 300  $\mu$ L 25 %-tne fosforne kiseline da se postigne pH-vrijednost manja od 2 pri kojoj svi karbonati i hidrogenkarbonati prelaze u  $CO_2$ .

Kisik (plin nosioc) s protokom 500 mL/min odvodi produkte izgaranja do ćelija nedisperzivnog infracrvenog detektora (engl. *Non-Dispersive Infrared*, NDIR) gdje se detektira  $CO_2$ . NDIR šalje detekcijski signal koji se bilježi u obliku pika, a površina ispod pika se automatski izračunava pomoću softvera (TOC-Control L, verzija 1.04) na temelju usporedbe s prethodno izrađenom kalibracijskom krivuljom za TC s kalijevim hidrogenftalatom kao standardom u koncentracijskom rasponu od 0,1 do 15 mg C ( $R^2 = 0,9976$ ) i za IC s natrijevim karbonatom kao standardom u koncentracijskom rasponu od 0,5 do 2,5 mg C ( $R^2 = 0,9983$ ). Dobiveni rezultati izraženi su u postotku (%) te preračunati na suhu tvar uzorka.

Udio ukupnog organskog ugljika u čvrstim uzorcima tropa grožđa ( $TOC_{T.G.}$ ) određen je iz razlike udjela ukupnog ugljika (TC) i anorganskog ugljika (IC).

#### *Određivanje TOC-a u ekstraktima tropa grožđa*

Koncentracija TOC-a u ekstraktima ( $TOC_E$ ) određena je odabirom izravne metode NPOC (engl. *non purgeable organic carbon*) u softveru (TOC-Control L, verzija 1.04), kojom je najprije iz tekućeg uzorka uklonjen anorganski ugljik dodatkom 1,5 % klorovodične kiseline (1 M), što je zadano prije pokretanja analize u postavkama softvera. Na taj se način anorganski ugljik prevodi u  $CO_2$  (uz platinu kao katalizator), koji se odvodi iz tekuće faze u struji sintetskog zraka, kao što se odvođe i anorganski visokohlapivi spojevi. Uzorak se zatim uvodi u oksidacijsku komoru gdje se oksidacijom pri 680 °C preostali ugljik prevodi u  $CO_2$ . Sintetski zrak (plin nosioc) koji prenosi nastali  $CO_2$  (protok 150 mL/min) hladi se i odvlažuje te prolazi kroz halogeni pročišćivač s ciljem uklanjanja halogenih elemenata do ćelija NDIR-a gdje se detektira  $CO_2$  (Ćeranić, 2016; Shimadzu Corporation, 2022). NDIR šalje detekcijski signal koji se bilježi u obliku pika, a površina ispod pika se automatski izračunava pomoću softvera na temelju usporedbe s prethodno izrađenom kalibracijskom krivuljom s kalijevim hidrogenftalatom kao standardom u koncentracijskom rasponu od 10 do 100 mgC/L ( $R^2 = 0,9996$ ). Dobiveni rezultat predstavlja koncentraciju ukupnog organskog ugljika u mg/L koji je preračunat na suhu tvar uzorka (mg/g<sub>st.</sub>).

#### *Određivanje TN-a u ekstraktima tropa grožđa*

Koncentracija TN-a je mjerena pomoću TNM-L jedinice za analizu ukupnog dušika u tekućim uzorcima metodom katalitičkog izgaranja pri 720 °C, prilikom čega sav dušik iz uzorka prelazi u dušikov monoksid koji reakcijom s ozonom stvara dušikove dioksidge detektirane pomoću kemiluminiscentnog detektora (engl. *Chemiluminescence Detector*, CLD). Signal detektora generira pik koji je proporcionalan koncentraciji dušika u uzorku (Shimadzu Corporation, 2020, Shimadzu Corporation, 2022). Usporedbom sa signalom standardnog uzorka na temelju prethodno izrađene kalibracijske krivulje s kalijevim nitratom kao standardom u koncentracijskom rasponu od 0 do 100 mgN/L ( $R^2 = 0,9999$ ) uređaj određuje koncentraciju TN-a izraženu u mg/L koja je preračunata na suhu tvar uzorka (mg/g<sub>st.</sub>).

#### ***Određivanje udjela neutralnih detergent vlakana (NDF), kiselih detergent vlakana (ADF) i kiselog detergent lignina (ADL)***

NDF, ADF i ADL određivani su prema Van Soest metodi (Goering i Soest, 1970) pomoću analizatora vlakana.

#### *Priprema otopina*

NDF otopina pripremljena je postepenim dodavanjem 6,81 g natrijevog tetraborata dekahidrata u 600 mL destilirane vode uz zagrijavanje. Nakon otapanja natrijevog borata dekahidrata, u



otopinu je dodano 20,6 g EDTA pri čemu je smanjena temperatura zbog isparavanja. Potom je dodano 30 g natrijevog dodecil sulfata i 10 mL 2-etoksietanola. Zasebno je otopljeno 5,72 g natrijevog hidrogen fosfata dihidrata u 100 mL destilirane vode uz zagrijavanje. Otopine su pomiješane u odmjernoj tikvici od 1 L koja je nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

ADF otopina pripravljena je na način da je 20 g heksadeciltrimetilamonij bromida otopljeno u 200 mL destilirane vode uz zagrijavanje. Odmjerna tikvica volumena 1 L koja je sadržavala 500 mL destilirane vode uronjena je u kupelj s hladnom vodom te je polako dodano 26,76 mL 0,5 M sumporne kiseline, a potom i prethodno pripravljena otopina heksadeciltrimetilamonij bromida, nakon čega je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

#### Postupak

Osušeni uzorak veličine čestica  $\leq 1$  mm odvagan je ( $1,0000 \pm 0,0001$  g) u filtarske lončice prethodno osušene ( $105$  °C, 60 min) i ohlađene u eksikatoru (30 min). Gučevi s uzorcima su postavljeni na uređaj za analizu vlakana. Za NDF analizu, u gučeve s uzorkom dodano je 0,5 g natrijevog sulfita, 100 mL NDF otopine i nekoliko kapi *n*-oktanola. Uzorci su zagrijani do ključanja te uz refluks zagrijavani 60 min, nakon čega slijedi filtriranje i ispiranje s kipućom vodom i hladnim acetonom te sušenje uzorka. Za ADF analizu u gučeve s izvaganim ostatkom nakon određivanja NDF-a je dodano 100 mL ADF otopine i nekoliko kapi *n*-oktanola, zagrijavano uz refluks 60 min, profiltrirano i isprano s kipućom vodom i hladnim acetonom te je ostatak osušen. ADL analiza je provedena tako da je u gučeve s uzorkom zaostalim nakon određivanja ADF-a, dodano 25 mL 72% sumporne kiseline, ostavljeno pri sobnoj temperaturi tijekom 3 sata uz miješanje uzorka svakih sat vremena, nakon čega su uzorci isprani kipućom vodom sve do neutralizacije.

Nakon provedbe analiza prema navedenom protokolu, uzorci su sušeni pri  $130$  °C tijekom 2 h, ohlađeni u eksikatoru i izvagani. Dodatno, korekcija ADL-a, odnosno udjela lignina na pepeo provedena je žarenjem zaostalog uzorka u mufolnoj peći pri  $550$  °C tijekom 2 sata.

NDF, ADF i ADL su izračunati prema jednadžbama (3.15) i (3.16):

$$\text{NDF / ADF} = \left( \frac{m_1}{m_{UZ} \times \frac{w_{s.t.}}{100}} \right) \times 100 \quad (3.15)$$

$$\text{ADL} = \left( \frac{m_1 - m_2}{m_{UZ} \times \frac{w_{s.t.}}{100}} \right) \times 100 \quad (3.16)$$

gdje je:  $m_1$  - ostatak nakon sušenja (g),  $m_2$  - ostatak nakon žarenja (g),  $w$  - udio suhe tvari uzorka (%), NDF - udio neutralnih detergent vlakana (%<sub>s.t.</sub>), ADF - udio kiselih detergent vlakana (%<sub>s.t.</sub>) i ADL - udio kiselog detergent lignina (%<sub>s.t.</sub>).

Udio hemiceluloze je izračunat kao razlika između NDF-a i ADF-a, udio celuloze kao razlika između ADF-a i ADL-a, dok ADL predstavlja udio lignina.

### **Određivanje udjela masti u uzorcima tropa grožđa**

Udio slobodnih masti određen je prema Soxhlet standardnoj metodi AAOC 945.16 (AOAC, 2005) korištenjem univerzalnog sustava za ekstrakciju.

#### *Postupak*

Dva grama uzorka izvagano je u frite koje su potom postavljene u komoru za ekstrakciju. Na uređaju je odabran standardni Soxhlet program koji uključuje ekstrakciju u trajanju 2 sata, ispiranje 5 minuta, isparavanje otapala iz uzorka i sušenje tijekom 15 minuta. Kontinuirana ekstrakcija je provedena s otapalom *n*-heksanom. Automatizirani sustav sadrži optički senzor razine koji omogućuje izvršavanje više ciklusa po satu i time čini ekstrakciju učinkovitijom i bržom. Tijekom svakog ciklusa, masti se ekstrahiraju otapalom, a Soxhlet ekstrakcijska komora se prazni kada se postigne postavljena razina. Na kraju ekstrakcije, slobodne masti su sakupljene u prethodno osušene i izvagane staklene tikvice, nakon čega je provedeno dodatno sušenje u sušioniku pri 105 °C tijekom 30 min, hlađenje u eksikatoru i vaganje. Udio masti izračunat je prema izrazu (3.17):

$$\% \text{ MASTI} = \frac{m_E}{m_{uz.}} \times 100 \quad (3.17)$$

gdje je:  $m_E$  - masa ekstrakta prikupljenog u staklenoj tikvici koji sadrži slobodne masti (g),  $m_{uz.}$  - masa uzorka korištenog za ekstrakciju (g). Udio masti je izražen u postotku (%) te je preračunat na suhu tvar uzorka.

### **Analiza minerala i nepoželjnih tvari u tropu grožđa**

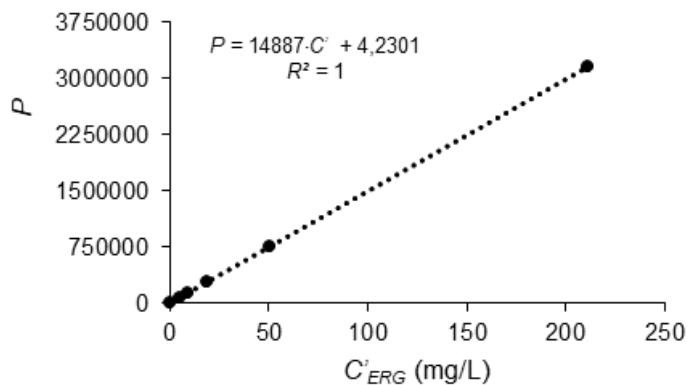
Minerali, teški metali, octena kiselina, mliječna kiselina, poliaromatski ugljikovodici (PAH) i poliklorirani bifenili (PCB) te mikotoksini analizirani su u akreditiranom laboratoriju. Udio fosfora je analiziran spektrofotometrijski prema HRN ISO 6491:2001. Udio kalcija, kalija, željeza, olova, kadmija i arsena je analiziran metodom RU-305-05, koja je akreditirana metoda u fleksibilnom području prema zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025:2017. Prisutnost octene i mliječne kiseline utvrđena je metodom RU-020-03. PAH i PCB analizirani su metodama RU-256-02 i RU-256-05, a mikotoksini metodom RU-287-04 (HRN EN ISO/IEC 17025:2017).

### **Određivanje koncentracije biomase u uzorcima tropa grožđa**

Koncentracija biomase određena je neizravnom metodom određivanjem koncentracije ergosterola prema protokolu autora Barreira i sur. (2014) uz modifikacije.

Metodologija određivanja koncentracije ergosterola uključuje metodu određivanja masti opisanu u prethodnom potpoglavlju, nakon čega je provedena saponifikacija na način da je u tikvice s ekstraktom dobivenim nakon ekstrakcije masti u uzorcima tropa grožđa dodano 2 mL askorbinske kiseline (0,1 M) i 10 mL kalijevog hidroksida (2 M). Tikvice su poklopljene i postavljene u vodenu kupelj s treslicom pri 60 °C, 125 rpm tijekom 45 minuta, nakon čega je sadržaj u tikvicama ohlađen na sobnu temperaturu i preko filter papira profiltriran u epruvete. U epruvete s profiltriranim sadržajem dodano je 2,5 mL natrijevog klorida (1,7 M) i 5 mL *n*-heksana, nakon čega slijedi miješanje na vorteksu tijekom 1 min. Sadržaj epruveta je ostavljen na stalku oko 1 min pri čemu dolazi do odvajanja vodenog sloja i sloja *n*-heksana koji sadrži sterole, zatim je sloj *n*-heksana odvojen pipetom u drugu epruvetu. Postupak ekstrakcije vodenog sloja ponovljen je još dva puta dodatkom novog alikvota od 5 mL *n*-heksana. Sve frakcije *n*-heksana su prikupljene u istu epruvetu u koju je dodano na vrh špatule natrijevog sulfata u svrhu isušivanja zaostale vode. Sadržaj epruvete je promiješan na vorteksu, profiltriran u tikvicu za uparavanje te uparen na rotavaporu pri 40 °C. Nakon uparavanja, sadržaj tikvice je otopljen dodatkom 2 mL metanola, profiltriran kroz membranu veličine pora 0,45 μm (Chromafil Xtra PTFE) i korišten za UHPLC analizu.

UHPLC analiza koncentracije ergosterola provedena je tako da je PDA detekcija provedena snimanjem spektra pri 280 nm, a razdvajanje pomoću kolone Shim-Pack GIST C18 (250 × 4,6 mm, 3 μm, Shimadzu, Kyoto, Japan) i primjenom izokratne metode s metanolom kao mobilnom fazom, protokom od 1 mL/min, pri 25 °C u trajanju od 20 min. Volumen injektiranja uzoraka bio je 20 μL. Ergosterol u uzorcima je identificiran usporedbom retencijskog vremena i UV-Vis spektra s autentičnim standardom analiziranim pri istim kromatografskim uvjetima. Kvantifikacija je provedena primjenom metode vanjskog standarda, a kalibracijska krivulja je prikazana na **Slici 3.20**. Podaci su obrađeni u programu LabSolutions (verzija 5.87), a masena koncentracija ergosterola ( $C'_{\text{ERG}}$ , mg/L) izražena je po gramu masti ( $C_{\text{ERG}}$ , mg/g<sub>M</sub>).



**Slika 3.20.** Kalibracijska krivulja za određivanje koncentracije ergosterola UHPLC metodom. Graf prikazuje ovisnost površine ispod pika ( $P$ ) o koncentraciji ergosterola ( $C'_{ERG}$ , mg/L)

### 3.3.7. Statistička analiza

Za obradu svih eksperimentalnih podataka korišteni su računalni programi Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington) i TIBCO Statistica (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornija).

Studentov t-test za zavisne uzorke na razini značajnosti od 95 % ( $p < 0,05$ ) korišten je za usporedbu srednjih vrijednosti koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva između nultog dana (biološki neobrađen uzorak tropa grožđa) i dana fermentacije kada je postignut maksimalni prinos pojedinačnih fenolnih spojeva.

Za testiranje značajnosti razlike među aritmetičkim sredinama uzoraka koji predstavljaju populacije, korištena je jednosmjerna analiza varijance, ANOVA. Nakon što je ANOVA pokazala postojanje statistički značajnih razlika među aritmetičkim sredinama promatranih populacija, provedena je daljnja analiza pomoću *post-hoc* testa, odnosno Duncanova testa višestrukih raspona kako bi se odredilo između kojih aritmetičkih sredina populacija postoji značajna razlika ( $p < 0,05$ ). Uzorci koji pripadaju istoj populaciji na slikama/tablicama označeni su istim malim slovom abecede. Uzorci označeni različitim malim slovima abecede pripadaju različitim populacijama, odnosno između njih postoji statistički značajna razlika.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

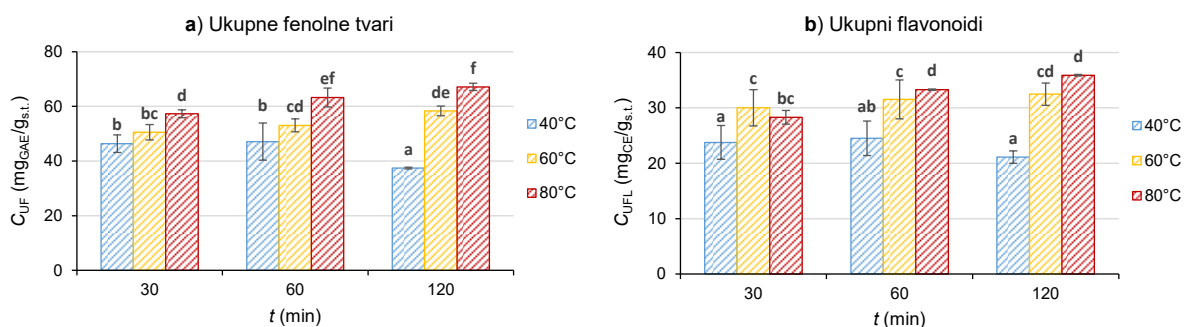
U ovom poglavlju prikazani su rezultati eksperimentalnog rada popraćeni s raspravom. Rezultati su podijeljeni u nekoliko osnovnih dijelova:

- određivanje optimalnih uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih spojeva iz tropa grožđa (način ekstrakcije, temperatura, koncentracija otapala, vrijeme ekstrakcije).
- *screening* profila pojedinačnih fenolnih spojeva u tropu grožđa (cabernet sauvignon 2016., CS 2016.) prije i nakon SSF-a pomoću 11 filamentoznih gljiva u laboratorijskim staklenkama.
- *screening* profila pojedinačnih fenolnih spojeva u tri različite sorte tropa grožđa (frankovka 2017. (F 2017.), merlot 2020. (M 2020.) i cabernet sauvignon 2017. (CS 2017.) prije i nakon SSF-a pomoću *P. eryngii* i *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama.
- SSF tropa grožđa (F 2017.) pomoću *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama te uvećanje mjerila SSF procesa u bioreaktor s pliticama. Ovaj dio rezultata uključuje analizu kemijskog sastava tropa grožđa prije i nakon biološke obrade pri čemu je u čvrstim uzorcima analiziran udio suhe tvari, pepela, proteina, masti, TOC-a ( $TOC_{T.G.}$ ), NDF, ADF, ADL (lignin), hemiceluloza i celuloza, dok je u tekućim ekstraktima analiziran udio pojedinačnih šećera (saharoze, glukoze, fruktoze), reducirajućih šećera, TOC-a ( $TOC_E$ ) i TN-a. Ovaj dio rezultata također uključuje analizu minerala, teških metala, octene i mliječne kiseline, poliaromatskih ugljikovodika (PAH) i polikloriranih bifenila (PCB) te mikotoksina, kao i koncentraciju biomase indirektnom metodom preko ergosterola, ispitivanje utjecaja SSF-a na udio ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanida te antioksidacijsku aktivnost ekstrakata tropa grožđa, zatim utjecaj SSF-a na udio pojedinačnih fenolnih tvari te korelaciju između hidrolitičkih i lignolitičkih enzima i pojedinačnih fenolnih tvari. Rezultati koji prikazuju gubitak na masi supstrata tijekom SSF-a u laboratorijskim staklenkama, kao i praćenje temperature tijekom SSF procesa u uvećanom mjerilu (temperatura unutar bioreaktora i u sloju supstrata) također su dio rezultata ovog poglavlja.

#### 4.1. ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA KRUTO-TEKUĆE EKSTRAKCIJE FENOLNIH SPOJEVA

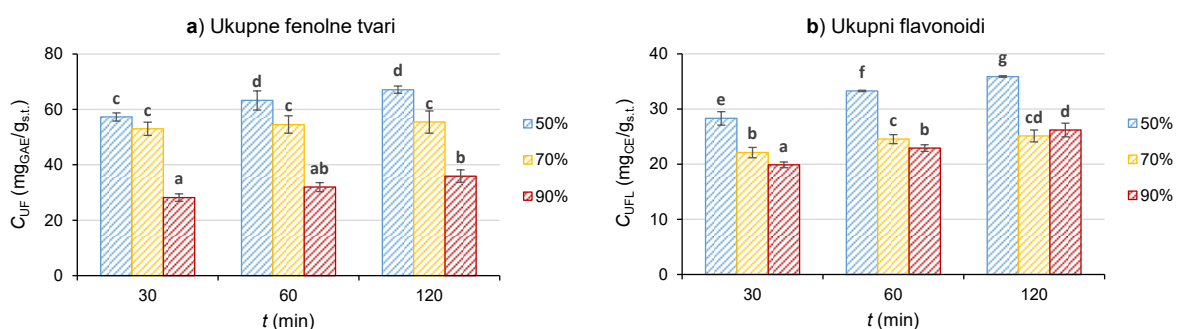
Rezultati dobiveni nakon provedbe dvije metode ekstrakcije (konvencionalna ekstrakcija otapalom u vodenoj kupelji i ekstrakcija otapalom potpomognuta ultrazvukom) prikazani su na **Slikama 4.1. – 4.6.**

U slučaju konvencionalne kruto-tekuće ekstrakcije ispitan je utjecaj temperature (40 °C, 60 °C i 80 °C), koncentracije vodene otopine etanola kao otapala (50 %, 70 % i 90 % v/v), broja okretaja tresilice (100 rpm, 150 rpm i 200 rpm) i vremena ekstrakcije (30 min, 60 min, 120 min) na prinos ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida iz tropa grožđa sorte cabernet sauvignon (**Slike 4.1. – 4.3.**).



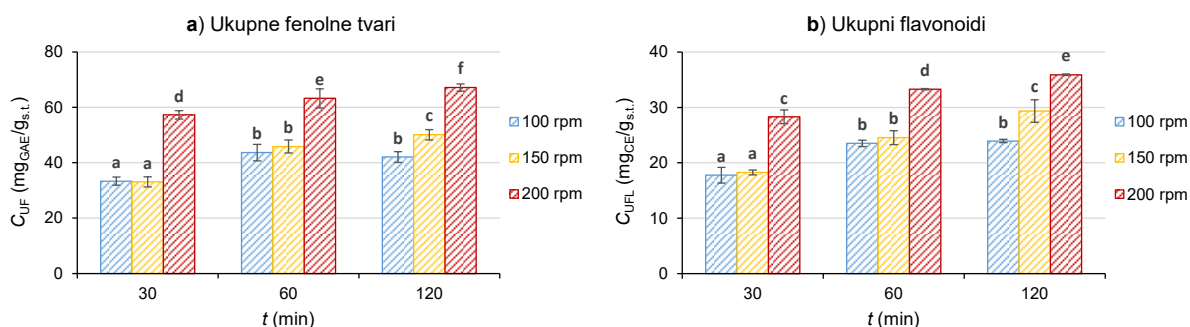
**Slika 4.1.** Utjecaj temperature (40 °C, 60 °C, 80 °C) na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari (a) i ukupnih flavonoida (b) iz tropa grožđa (CS 2016.) tijekom konvencionalne kruto-tekuće ekstrakcije (uvjeti ekstrakcije: 50 %-tni etanol, 200 rpm, 30-60-120 minuta). Uzorci označeni različitim malim slovima abecede međusobno su statistički značajno različiti ( $p < 0,05$ , *post-hoc* Duncanov test višestrukih raspona).

Kao što je vidljivo na **Slici 4.1.**, porast temperature i vrijeme ekstrakcije utjecali su na povećanje masenog udjela ukupnih fenolnih spojeva i ukupnih flavonoida. Najveći ekstrakcijski prinos ostvaren je pri temperaturi od 80 °C i vremenu trajanja ekstrakcije tijekom 120 minuta. Pri ispitivanim uvjetima ekstrakcije, maseni udio ukupnih fenolnih tvari kretao se u rasponu 37,42 - 67,13 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub>, a maseni udio ukupnih flavonoida u rasponu 21,12 - 35,90 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub>.



**Slika 4.2.** Utjecaj koncentracije otapala (50 %, 70 %, 90 %) na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari (a) i ukupnih flavonoida (b) iz tropa grožđa (CS 2016.) tijekom konvencionalne kruto-tekuće ekstrakcije (uvjeti ekstrakcije: 80 °C, 200 rpm, 30-60-120 minuta). Uzorci označeni različitim malim slovima abecede međusobno su statistički značajno različiti ( $p < 0,05$ , *post-hoc* Duncanov test višestrukih raspona).

Na **Slici 4.2.** je vidljivo da je najveći ekstrakcijski prinos ostvaren s 50 %-tnim etanolom tijekom 120 minuta ekstrakcije. Primjenom 70 %-tnog i 90 %-tnog etanola ostvaren je slabiji prinos analiziranih spojeva iz razloga što 50 %-tni etanol ima veću polarnost te bolje ekstrahira polarne komponente kao što su fenolne tvari. Pri ispitivanim uvjetima, maseni udio ukupnih fenolnih tvari kretao se u rasponu 28,16 - 67,13 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub>, a maseni udio ukupnih flavonoida u rasponu 19,88 - 35,90 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub>.



**Slika 4.3.** Utjecaj broja okretaja tresilice (100 rpm, 150 rpm, 200 rpm) na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari (a) i ukupnih flavonoida (b) iz tropa grožđa (CS 2016.) tijekom konvencionalne kruto-tekuće ekstrakcije (uvjeti ekstrakcije: 50 %-tni etanol, 80 °C, 30-60-120 minuta). Uzorci označeni različitim malim slovima abecede međusobno su statistički značajno različiti ( $p < 0,05$ , *post-hoc* Duncanov test višestrukih raspona).

Na **Slici 4.3.** vidljivo je da povećanje broja okretaja tresilice pozitivno utječe na ekstrakcijski prinos fenolnih tvari iz tropa grožđa, budući da miješanje uzrokuje veću turbulenciju i tako doprinosi bržem prijenosu tvari koji se tijekom ekstrakcije odvija difuzijom. Dobiveni rezultati pokazuju da je najveći ekstrakcijski prinos ostvaren pri broju okretaja od 200 rpm, a smanjenjem broja okretaja tresilice smanjivao se i ekstrakcijski prinos fenolnih tvari.

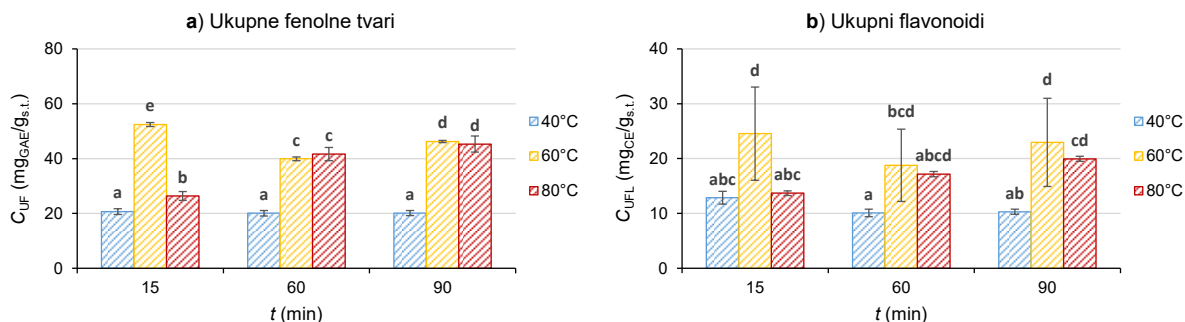
Rezultati ispitivanja procesnih uvjeta konvencionalne kruto-tekuće ekstrakcije fenolnih tvari iz tropa grožđa sorte cabernet sauvignon (CS 2016) (**Slike 4.1. – 4.3.**) pokazuju da su optimalni uvjeti pri kojima su ekstrahirane najveće koncentracije ukupnih fenolnih tvari (67,13 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub>) i ukupnih flavonoida (35,90 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub>), kako slijedi:

- temperatura ekstrakcije: 80 °C
- ekstrakcijsko otapalo: 50 %-tna vodena otopina etanola
- broj okretaja tresilice: 200 rpm
- vrijeme ekstrakcije: 120 min
- omjer kruto-tekuće: 40 mL/g.

U slučaju ultrazvučne ekstrakcije ispitan je utjecaj temperature (40 °C, 60 °C, 80 °C), koncentracije vodene otopine etanola kao otapala (50 %, 70 % i 90 % v/v) i snage ultrazvuka (40 %, 60 % i 80 % od maksimalne snage) vremena (15 min, 60 min i 90 min) na prinos

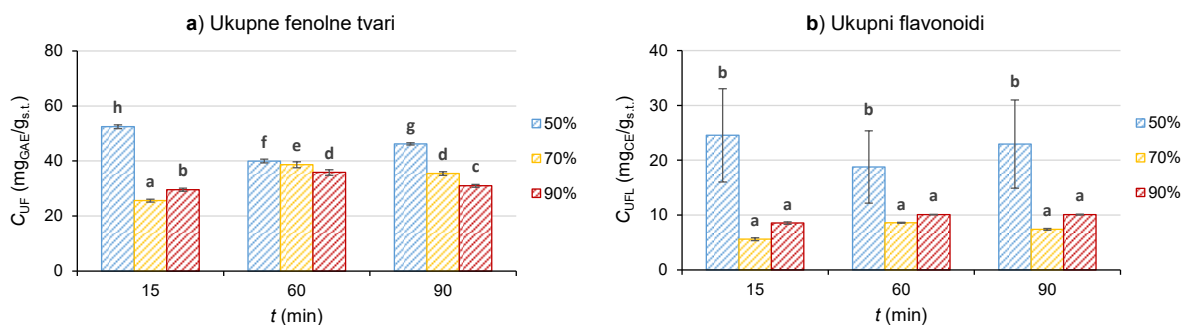


ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari i ukupnih flavonoida iz tropa grožđa sorte cabernet sauvignon. Ekstrakcija je provedena u *sweep* modu pri 37 kHz (**Slike 4.4. – 4.6.**).



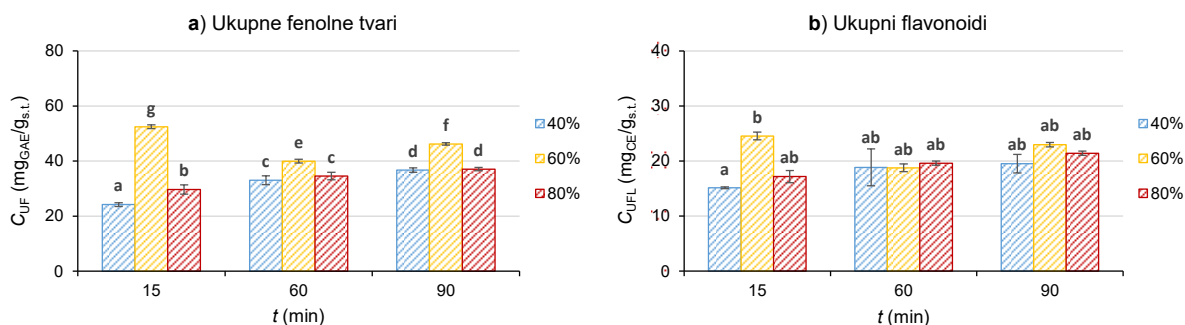
**Slika 4.4.** Utjecaj temperature (40 °C, 60 °C, 80 °C) na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari (a) i ukupnih flavonoida (b) iz tropa grožđa (CS 2016.) tijekom kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (uvjeti ekstrakcije: 50 %-tni etanol, snaga ultrazvuka 60 %, *sweep mode*, frekvencija 37 kHz, 15-60-90 minuta). Uzorci označeni različitim malim slovima abecede međusobno su statistički značajno različiti ( $p < 0,05$ , *post-hoc* Duncanov test višestrukih raspona).

Na **Slici 4.4.** je vidljivo da je najveći ekstrakcijski prinos ostvaren pri temperaturi 60 °C nakon 15 minuta ekstrakcije kada je maseni udio ukupnih fenolnih tvari iznosio 52,45 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub>, a maseni udio ukupnih flavonoida 24,55 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub>



**Slika 4.5.** Utjecaj koncentracije otapala (50 %, 70 %, 90 %) na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari (a) i ukupnih flavonoida (b) iz tropa grožđa (CS 2016.) tijekom kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (uvjeti ekstrakcije: temperatura 60 °C, snaga ultrazvuka 60 %, *sweep mode*, frekvencija 37 kHz, 15-60-90 minuta). Uzorci označeni različitim malim slovima abecede međusobno su statistički značajno različiti ( $p < 0,05$ , *post-hoc* Duncanov test višestrukih raspona).

Na **Slici 4.5.** može se vidjeti da se najboljim otapalom za ekstrakciju fenolnih tvari pokazala 50 %-tna vodena otopina etanola tijekom cijelog ispitivanog vremenskog intervala, s najvećim ekstrakcijskim prinosom uočenim nakon 15 minuta ekstrakcije. Razlika se posebno može uočiti u slučaju ukupnih flavonoida kod kojih je ostvaren 2 – 4 puta veći prinos primjenom 50 %-tne vodene otopine etanola u odnosu na 70 %-tni i 90 %-tni etanol.



**Slika 4.6.** Utjecaj snage ultrazvuka (40 %, 60 %, 80 % od maksimalne snage) na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari (a) i ukupnih flavonoida (b) iz tropa grožđa (CS 2016.) tijekom kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (uvjeti ekstrakcije: 50 %-tni etanol, temperatura 60 °C, *sweep mode*, frekvencija 37 kHz, 15-60-90 minuta). Uzorci označeni različitim malim slovima abecede međusobno su statistički značajno različiti ( $p < 0,05$ , *post-hoc* Duncanov test višestrukih raspona).

Na **Slici 4.6.** se može vidjeti da se pri ispitivanim uvjetima maseni udio ukupnih fenolnih tvari kretao u rasponu 24,19 – 52,45 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub>, a ukupnih flavonoida u rasponu 15,13 – 24,55 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub>. Najbolja učinkovitost ekstrakcije ukupnih fenolnih tvari postignuta je primjenom 60 % maksimalne snage ultrazvuka nakon 15 minuta, pri čemu je u ekstraktu zabilježena i najveća koncentracija ekstrahiranih ukupnih flavonoida, no ona se nije statistički značajno razlikovala od koncentracije ekstrahiranih ukupnih flavonoida određenih u ekstraktim dobivenim pri ostalim uvjetima.

Rezultati ispitivanja procesnih uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije potpomognute ultrazvukom fenolnih tvari iz tropa grožđa sorte cabernet sauvignon (CS 2016) (**Slike 4.4. – 4.6.**) pokazuju da su optimalni uvjeti pri kojima su ekstrahirane najveće koncentracije ukupnih fenolnih tvari (52,45 mg<sub>GAE</sub>/g<sub>s.t.</sub>) i ukupnih flavonoida (24,55 mg<sub>CE</sub>/g<sub>s.t.</sub>), kako slijedi:

- temperatura ekstrakcije: 60 °C
- ekstrakcijsko otapalo: 50 %-tna vodena otopina etanola
- snaga ultrazvuka: 60 % maksimalne snage
- vrijeme ekstrakcije: 15 min
- omjer kruto-tekuće: 40 mL/g.

Što se tiče vremena ekstrakcije, rezultati su pokazali da je najveći prinos fenolnih spojeva ostvaren nakon 15 minuta, nakon čega je maseni udio fenolnih spojeva opadao. Ovo potvrđuje i pretpostavku da primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom skraćuje vrijeme potrebno za ekstrakciju u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju. Međutim, veće standardne devijacije rezultata pokazuju manje jasnu razliku između utjecaja pojedinog procesnog parametra na prinos fenolnih tvari u ekstraktima, što je potvrdila ANOVA i *post-hoc* Duncanov test višestrukih

raspona. Razlog tome može biti i činjenica da primjena ultrazvuka uzrokuje porast temperature ekstrakcijske smjese koji nije bilo moguće kontrolirati, a taj porast temperature može biti različit i u dva paralelna pokusa s obzirom da je trop grožđa heterogeni uzorak (kožica, sjemenke, peteljke).

Slijedom navedenog, konvencionalna metoda kruto-tekuće ekstrakcije pokazala se prikladnijom u smislu dobivanja većeg ekstrakcijskog prinosa fenolnih tvari iz tropa grožđa te je odabrana kao metoda ekstrakcije u daljnjem radu. Primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom moguće je ubrzati ekstrakciju, međutim prinosi fenolnih spojeva su bili manji, a UHPLC kromatogrami su kod ovog načina ekstrakcije sadržavali pikove nepravilnog oblika uzrokovanih primjenom ultrazvuka te je podatke bilo teže obrađivati. Kako je jedan od glavnih ciljeva ove disertacije analiza profila fenolnih spojeva nakon biološke obrade tropa grožđa, konvencionalna kruto-tekuća ekstrakcija je odabrana kao metoda koja će se koristiti za daljnja istraživanja.

#### **4.2. SCREENING PROFILA FENOLNIH SPOJEVA U TROPU GROŽĐA PRIJE I NAKON FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA S RAZLIČITIM FILAMENTOZNIM GLJIVAMA**

*Screening* profila pojedinačnih fenolnih tvari u ekstraktima tropa grožđa sorte cabernet sauvignon, berba 2016 (CS 2016.) prije i nakon biološke obrade pomoću različitih filamentoznih gljiva analiziran je UHPLC metodom (Bucić-Kojić et al., 2017). U svim analiziranim ekstraktima identificiran je i kvantificiran 21 fenolni spoj od 27 dostupnih standarda navedenih u potpoglavlju „*Kemikalije*“. Tirozol, *p*-hidroksifeniloctena kiselina, epigalokatehin, klorogenska kiselina, sinapinska kiselina i miricetin nisu identificirani niti u jednom od analiziranih uzoraka. SSF unutar eksperimentalnih uvjeta je imala pozitivan utjecaj na ekstraktibilnost 18 pojedinačnih fenolnih tvari, čiji su udjeli prije („0.“ dan,  $C_0$ ) i nakon SSF (maksimalni udio pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa zabilježen nakon određenog trajanja SSF s pojedinom filamentoznom gljivom,  $C_{i,max}$ ) navedeni u **Tablici 3**. U slučaju kafeinske kiseline, katehina i epikatehina nije ostvareno povećanje prinosa nakon SSF, stoga ti podaci nisu prikazani u rezultatima.

**Tablica 3.** Udio pojedinačnih fenolnih tvari u ekstraktima tropa grožđa (CS 2016.) dobivenim prije SSF („0.“ dan,  $C_0$ ) i nakon SSF (maksimalni udio pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa zabilježen nakon određenog vremena trajanja SSF-a s pojedinom filamentoznom gljivom,  $C_{i,max.}$ )

Pojedinačne fenolne tvari	Mikroorganizam	$t_{SSF}$ (dan)	$C_0^*$ ( $\mu\text{g/g.s.t.}$ )	$C_{i,max.}^*$ ( $\mu\text{g/g.s.t.}$ )	$p^{**}$
<b>Fenolne kiseline (hidroksibenzojeve kiseline)</b>					
Galna kiselina	<i>R. oryzae</i>	2.	267,77 ± 11,78	586,43 ± 12,48	0,0000
Elaginska kiselina	<i>C. subvermispota</i>	15.	34,65 ± 3,66	303,72 ± 25,89	0,0023
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	<i>R. oryzae</i>	2.	5,05 ± 0,22	14,37 ± 0,23	0,0008
Siringinska kiselina	<i>P. eryngii</i>	10.	86,37 ± 2,15	205,13 ± 0,01	0,0001
Vanilinska kiselina	<i>R. oryzae</i>	2.	40,54 ± 0,21	63,35 ± 1,57	0,0012
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	<i>H. grisea</i>	15.	138,61 ± 9,87	699,30 ± 20,78	0,0010
<b>Fenolne kiseline (hidroksicimetne kiseline)</b>					
Ferulinska kiselina	<i>G. lucidum</i>	1.	4,78 ± 0,20	5,95 ± 0,21	0,0385
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	<i>T. versicolor</i> AG613	15.	4,43 ± 0,11	33,36 ± 0,37	0,0000
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	<i>R. oryzae</i>	1.	8,76 ± 0,70	14,63 ± 0,16	0,0029
<b>Flavan-3-oli</b>					
Epikatehin galat	<i>T. versicolor</i> AG613	15.	166,69 ± 8,42	519,13 ± 5,20	0,0000
Galokatehin galat	<i>P. eryngii</i>	10.	291,57 ± 2,35	1064,70 ± 0,25	0,0000
<b>Flavonoli</b>					
Kvercetin	<i>P. eryngii</i>	10.	173,32 ± 16,54	662,63 ± 6,68	0,0001
Kaempferol	<i>P. eryngii</i>	10.	10,22 ± 1,06	45,25 ± 0,82	0,0236
Rutin	<i>P. eryngii</i>	2.	44,20 ± 0,54	51,51 ± 1,54	0,0010
<b>Procijanidini</b>					
Procijanidin B1	<i>R. oryzae</i>	10.	304,27 ± 0,37	1368,26 ± 18,19	0,0001
Procijanidin B2	<i>P. eryngii</i>	2.	619,59 ± 7,90	692,75 ± 10,35	0,0201
<b>Stilbeni</b>					
Resveratrol	<i>P. eryngii</i>	5.	46,07 ± 3,48	69,65 ± 0,97	0,0037
$\epsilon$ -Viniferin	<i>G. resinaceum</i>	4.	17,52 ± 1,64	51,80 ± 0,35	0,0005

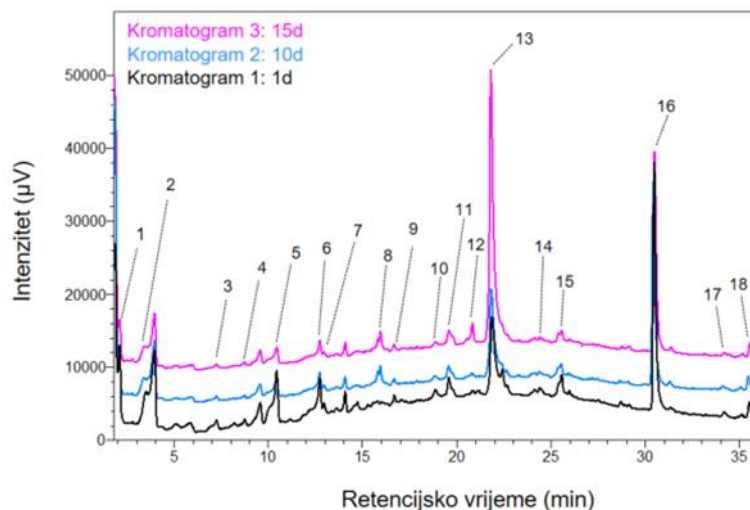
\* Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ( $n = 3$ ) ± SD.

\*\* Za usporedbu srednjih vrijednosti koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva između „0.“ dana (biološki neobrađen uzorak tropa grožđa) i dana fermentacije kada je postignut maksimalni prinos pojedinačnih fenolnih spojeva korišten je Studentov t-test za zavisne uzorke uz stupanj sigurnosti 95 % (crveno obojene vrijednosti - statistički značajna razlika uz  $p < 0,05$ ).

Prinos 18 pojedinačnih fenolnih tvari navedenih u **Tablici 3.** povećao se u rasponu od 1,12 do 8,76 puta nakon SSF-a, u usporedbi s početnim biološki neobrađenim uzorkom. *Screening* profila fenolnih spojeva u početnom neobrađenom uzorku tropa grožđa i u uzorcima nakon biološke obrade s različitim filamentoznim gljivama tijekom 15 dana pokazao je da SSF ima pozitivan utjecaj na povećanje prinosa fenolnih spojeva iz tropa grožđa, pri čemu su se ukupno gledajući najučinkovitijima u povećanju koncentracije većine fenolnih spojeva pokazale filamentozne gljive *P. eryngii* i *R. oryzae*. Od svih fenolnih spojeva kod kojih je postignuto

povećanje koncentracije nakon SSF-a, kod elaginske kiseline je uočen najveći porast koncentracije i to za 8,76 puta nakon 15. dana biološke obrade s *C. subvermispota* u usporedbi s neobrađenim početnim uzorkom.

**Slika 4.7.** prikazuje primjere UHPLC kromatograma fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa nakon 1., 10. i 15. dana SSF-a pomoću *C. subvermispota*, dobivenih snimanjem spektra pri valnoj duljini od 254 nm. Označeni fenolni spojevi su: (1) galna kiselina, (2) 3,4 dihidroksibenzojeva kiselina, (3) *p*-hidroksibenzojeva kiselina, (4) procijanidin B1, (5) vanilinska kiselina, (6) siringinska kiselina, (7) procijanidin B2, (8) *p*-kumarinska kiselina, (9) galokatehin galat, (10) ferulinska kiselina, (11) epikatehin galat, (12) *o*-kumarinska kiselina, (13) elaginska kiselina, (14) rutin, (15) resveratrol, (16) kvercetin, (17)  $\epsilon$ -viniferin i (18) kaempferol.

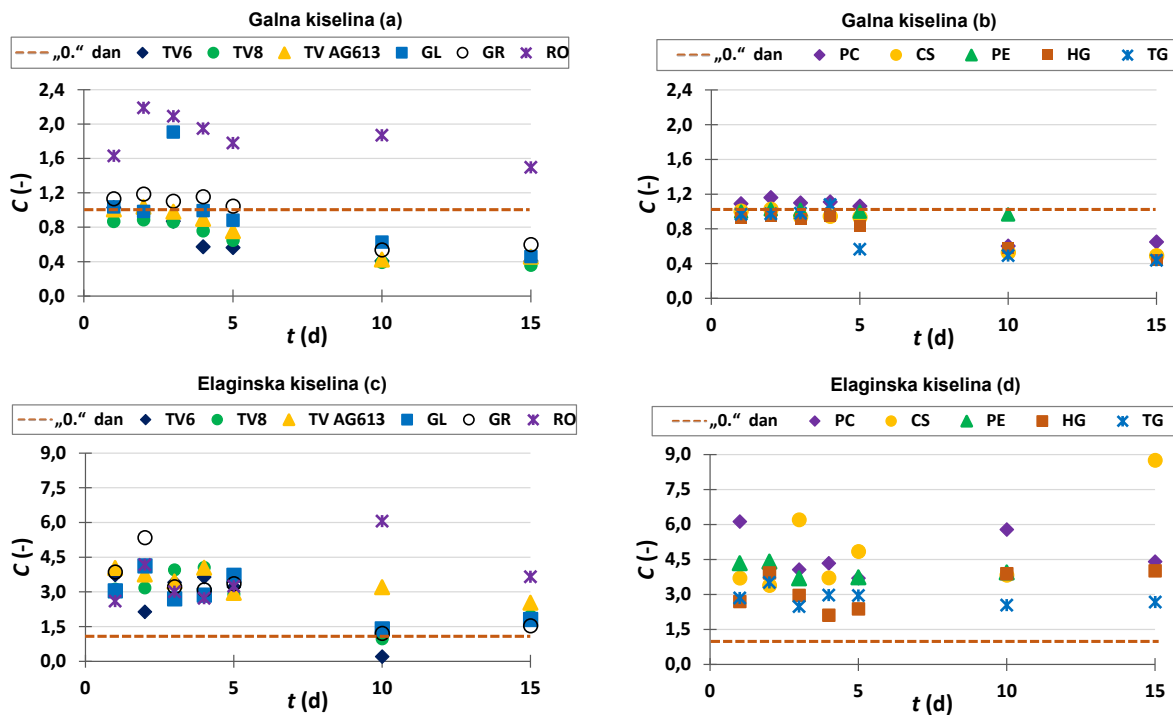


**Slika 4.7.** UHPLC kromatogrami fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa (CS 2016.) nakon 1., 10. i 15. dana SSF-a pomoću *C. subvermispota*

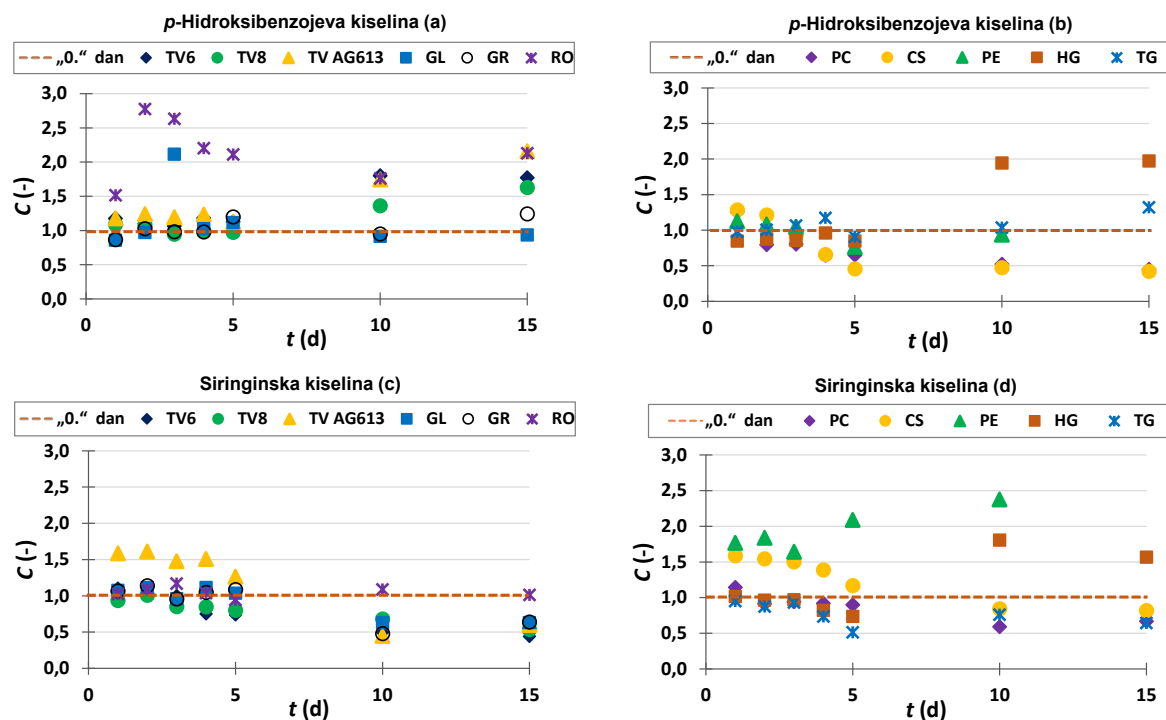
Kako bi se jasnije prikazali rezultati i bolje ilustrirao utjecaj biološke obrade pomoću određenih filamentoznih gljiva na udio fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa, rezultati su prikazani kao bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_o$ ) fenolnih spojeva ostvaren nakon određenog vremena trajanja SSF-a (**Slike 4.8. – 4.17.**). Bezdimenzijski udio označava omjer između udjela fenolnih spojeva nakon biološke obrade i udjela fenolnih spojeva u početnom biološki neobrađenom uzorku. Linija u svakom grafu prikazuje udio određenog fenolnog spoja u biološki neobrađenom uzorku („0.“ dan). Vrijednosti iznad linije označavaju porast, a vrijednosti ispod linije ukazuju na smanjenje udjela fenolnih spojeva nakon biološke obrade.

### 4.2.1. Fenolne kiseline

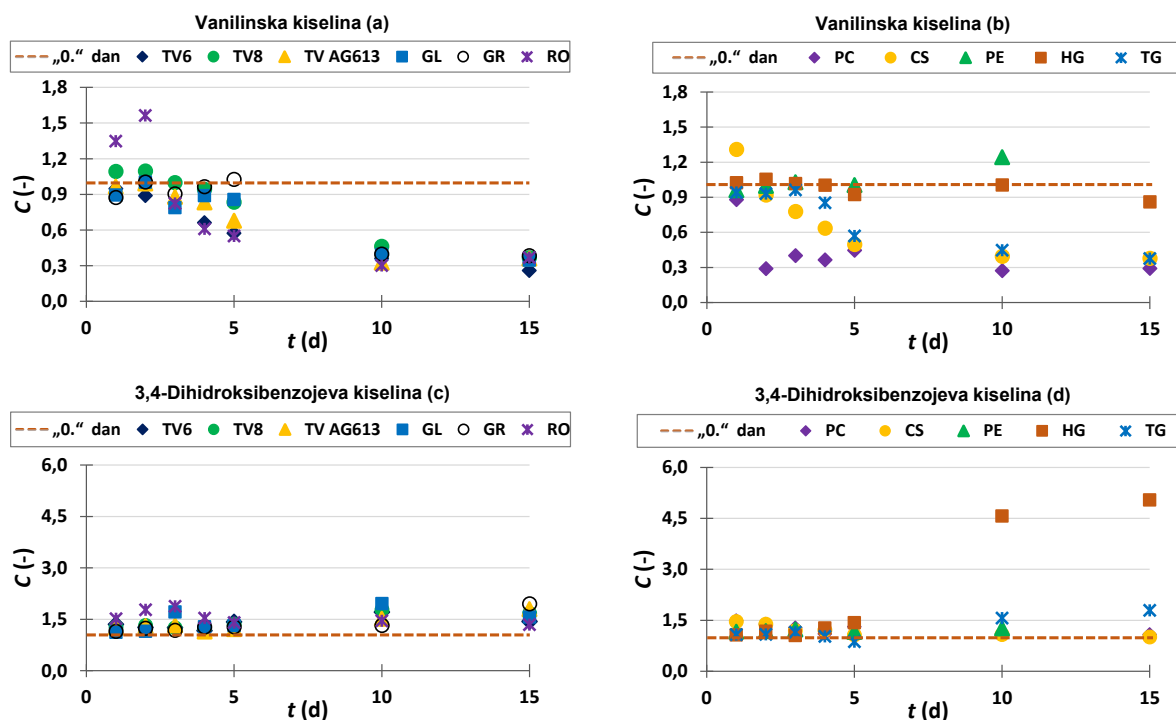
**Slike 4.8. – 4.10.** prikazuju bezdimenzijski udio hidroksibenzojevih kiselina (galna kiselina, elaginska kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, siringinska kiselina, vanilinska kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina) u ekstraktima tropa grožđa prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s različitim filamentoznim gljivama (TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO, PC, CS, PE, HG i TG).



**Slika 4.8.** Bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) galne kiseline (a,b) i elaginske kiseline (c,d) u ekstraktima tropa grožđa (CS 2016.) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO (a,c) i PC, CS, PE, HG, TG (b,d)



**Slika 4.9.** Bezdimezijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) *p*-hidroksibenzojeve kiseline (a,b) i siringinske kiseline (c,d) u ekstraktima tropa grožđa (CS 2016.) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO (a,c) i PC, CS, PE, HG, TG (b,d)



**Slika 4.10.** Bezdimezijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) vanilinske kiseline (a,b) i 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline (c,d) u ekstraktima tropa grožđa (CS 2016.) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO (a,c) i PC, CS, PE, HG, TG (b,d)

Kao što je prikazano na **Slici 4.8.a,b**, biološka obrada s RO, GL, GR, PC i TG imala je pozitivan utjecaj na ekstrakcijski prinos galne kiseline iz tropa grožđa tijekom prvih 5 dana. Najznačajniji porast udjela galne kiseline za 2,2 puta postignut je nakon 2 dana biološke obrade tropa grožđa pomoću RO. Udio galne kiseline u neobrađenom uzorku iznosio je  $267,77 \pm 11,78 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ , a u uzorku nakon trećeg dana biološke obrade iznosio je  $586,43 \pm 12,48 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$  (**Slika 4.8.a, Tablica 3.**). Meini i sur. (2021) dokazali su značajno povećanje galne kiseline kada su *A. niger* i *A. oryzae* korišteni za biološku obradu tropa grožđa u uvjetima SSF. Budući da RO proizvodi enzim tanazu, njegova prisutnost može utjecati na otpuštanje galne kiseline iz taninske kiseline, hidrolizabilnih tanina, galoiliranih katehina i procijanidina prisutnih u tropu grožđa (Meini et al., 2021; Purohit et al., 2006, Sobal et al., 2003). Galna kiselina ima različite biološke funkcije u liječenju brojnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, rak i neurodegenerativni poremećaji. Posjeduje antioksidativna, antivirusna, anti-age, antikancerogena, antibakterijska, antifungalna, protuupalna i antidijabetička svojstva. Upravo zbog navedenih svojstava smatra se obećavajućim spojem za razvoj novih lijekova, a njezina zastupljenost u prirodi i bioaktivnost čine ju važnim elementom u razvoju novih učinkovitih farmakofora. Štoviše, studije su pokazale da galna kiselina i njeni derivati mogu selektivno inducirati smrt stanica raka apoptozom bez oštećenja zdravih stanica (AL Zahrani et al., 2020).

Elaginska kiselina je dimerni derivat galne kiseline, koja je u biljkama uglavnom esterski vezana na šećere koji su sastavni dio elagitanina (hidrolizabilnih tanina). Ima široku primjenu u prehrambenoj industriji i biomedicini zbog blagotvornog djelovanja na ljudsko zdravlje, ali slaba dostupnost na tržištu i visoke cijene ograničavaju njezinu primjenu (Evtjugin et al., 2020). Komercijalna elaginska kiselina se uglavnom dobiva ekstrakcijom biljnih frakcija bogatih elagitaninom pomoću otapala kiselina-metanol i kiselinskom hidrolizom. Međutim, zbog problema u pročišćavanju, niskih prinosa i visokih troškova, postoji potreba za razvojem alternativnih tehnologija koje se pokazuju učinkovitijima u postizanju čisteg proizvoda, većeg prinosa i nižih troškova proizvodnje. Stoga se provode intenzivna istraživanja biotehnoloških procesa za proizvodnju elaginske kiseline (Evtjugin et al., 2020). U ovom istraživanju, biološka obrada sa svih 11 primijenjenih mikroorganizama (**Slika 4.8.c,d**) rezultirala je povećanjem udjela elaginske kiseline tijekom svih 15 dana fermentacije, osim 10. dan biološke obrade s TV8 i TV6, kada je udio elaginske kiseline bio niži u odnosu na neobrađeni uzorak. Najznačajniji porast udjela elaginske kiseline s  $34,65 \pm 3,66 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$  na  $303,72 \pm 25,89 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$  (8,8 puta) uočen je nakon 15. dana SSF pomoću CS (**Slika 4.8.d, Tablica 3.**).

*p*-hidroksibenzojeva kiselina je fenolna kiselina koja se nalazi u voću, povrću i drugim biljkama. Široko se koristi u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (kao antioksidans, konzervans, fungicid u hrani, pićima, lijekovima i kozmetici). Antioksidativna svojstva *p*-hidroksibenzojeve kiseline imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje jer može eliminirati



slobodne radikale povezane s fiziologijom raznih bolesti, poput upalnih i degenerativnih bolesti (Li i Row, 2021; Wang i Jiang, 2022). Biološka obrada tropa grožđa s RO, TV6, TV8, TV AG613, GL i GR pozitivno je utjecala na prinos *p*-hidroksibenzojeve kiseline, pri čemu je najveći porast (za 2,8 puta) zabilježen nakon tri dana biološke obrade s RO (**Slika 4.9.a**). Udio *p*-hidroksibenzojeve kiseline u biološki neobrađenom uzorku iznosio je  $5,05 \pm 0,22 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ , a u uzorku nakon tri dana biološke obrade iznosio je  $14,37 \pm 0,23 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$  (**Tablica 3.**). U slučaju SSF s filamentoznim gljivama PC, PE i CS, značajan porast udjela *p*-hidroksibenzojeve kiseline uočen je nakon 1. i 2. dana fermentacije, a s HG i TG nakon 10. i 15. dana SSF (**Slika 4.9.b**).

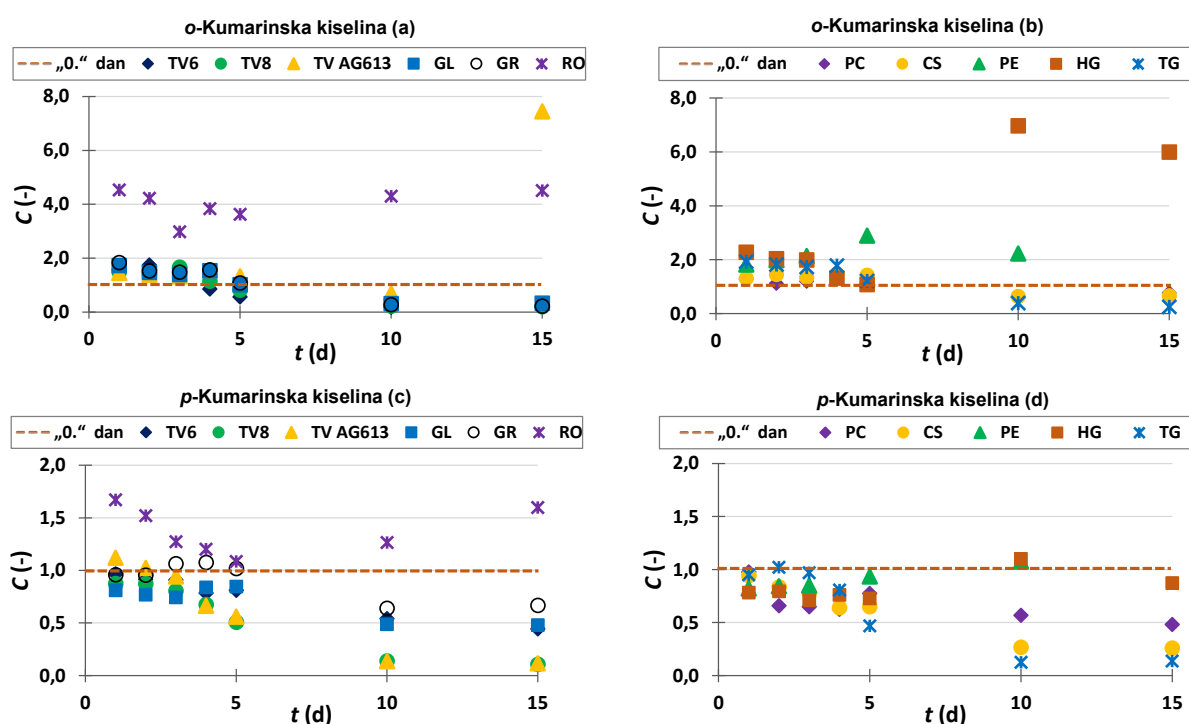
Siringinska kiselina i njezini derivati nalaze se u raznim biljnim proizvodima i određenim vrstama gljiva. Zajedno s brojnim drugim fenolnim spojevima, siringinska kiselina pridonosi strukturnom integritetu lignina. Zahvaljujući fenolnoj jezgri s različitim fenolnim skupinama, ima snažan antioksidativni kapacitet i antikancerogena, protuupalna, antidiijabetička, neuroprotektivna, antiendotoksična, hepatoprotektivna i kardioprotektivna svojstva (Srinivasulu et al., 2018). Upravo zbog svog terapijskog djelovanja ima veliku važnost za primjenu u biomedicini. Posjeduje svojstva smanjenja nastanka karijesa te se koristi u proizvodnji zubnog cementa i vrlo je tražena u industriji bioremedijacije, fotokatalitičkoj ozonizaciji i aktivaciji lakaze u industriji pulpe (Srinivasulu et al., 2018). U ovom istraživanju, PE je filamentozna gljiva koja je pokazala najbolji utjecaj (**Slika 4.9.c,d**) na povećanje ekstrakcijskog prinosa siringinske kiseline iz tropa grožđa, s povećanjem od 2,4 puta nakon 10. dana biološke obrade. U biološki neobrađenom uzorku udio siringinske kiseline iznosio je  $86,37 \pm 2,15 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ , a u uzorku nakon 10. dana biološke obrade s PE iznosio je  $205,13 \pm 0,01 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$  (**Tablica 3.**). Siringinska kiselina i vanilinska kiselina mogu djelovati na smanjenje markera fibroze, jetrenog hidroksiprolina, i suprimirati agregaciju kolagena (Ingole et al., 2021).

Vanilinska kiselina je oksidirani oblik vanilina i prirodna fenolna kiselina za koju se pokazalo da posjeduje različita farmakološka svojstva (antioksidativna, antiapoptotička, hepatoprotektivna, kardioprotektivna, imunostimulirajuća, protuupalna, neuroprotektivna). Ima važnu ulogu u prevenciji upala i neuroloških bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest (Sharma et al., 2020). Kao što je vidljivo na **Slici 4.10.a,b** biološka obrada tropa grožđa s RO, TV8, CS i HG rezultirala je povećanjem udjela vanilinske kiseline tijekom prva dva dana fermentacije, dok je SSF s PE rezultirala povećanjem njenog udjela nakon 10. dana. Uzgoj preostalih mikroorganizama na tropu grožđa uzrokovao je smanjenje udjela vanilinske kiseline. Udio vanilinske kiseline u početnom biološki neobrađenom uzorku iznosio je  $40,54 \pm 0,21 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ , a najznačajniji porast udjela za 1,56 puta uočen je nakon dva dana biološke obrade s RO ( $63,35 \pm 1,57 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ ) (**Slika 4.10.a, Tablica 3.**). U istraživanju koje su

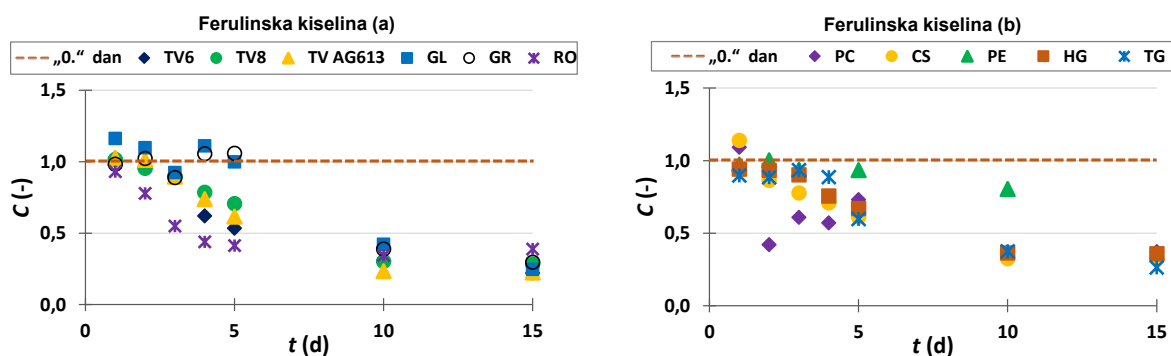
proveli autori (Bucić-Kojić et al., 2020), prikazano je povećanje prinosa vanilinske kiseline za 1,2 puta tijekom prva 4 dana biološke obrade tropa grožđa pomoću TV6.

Antikancerogena, antivirusna, antibakterijska, antihiperlipidemička, antiaterosklerotska, nematocidna i antidijabetička svojstva posjeduje i 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (protokatehuinska kiselina) koja pronalazi primjenu i kao kemijski građevni blok u proizvodnji polimera i plastike (Lubbers i de Vries, 2021). Udio 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline je porastao nakon biološke obrade tropa grožđa sa svim primijenjenim filamentoznim gljivama tijekom svih 15 dana fermentacije, osim u ekstraktu dobivenom nakon 5. dana SSF pomoću TG (**Slika 4.10.c,d**). Najznačajniji porast (za 5,0 puta) u ekstrakcijskog prinosa 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline uočen je nakon 15. dana biološke obrade pomoću HG (**Slika 4.10.d, Tablica 3.**).

**Slike 4.11.** i **4.12.** prikazuju bezdimenzijski udio hidroksicimetnih kiseline (*o*-kumarinska kiselina, *p*-kumarinska kiselina i ferulinska kiselina) u ekstraktima tropa grožđa prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s 11 filamentoznih gljiva (TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO, PC, CS, PE, HG i TG).



**Slika 4.11.** Bezdimenzijski udio ( $C = C/C_0$ ) *o*-kumarinske kiseline (**a,b**) i *p*-kumarinske kiseline (**c,d**) u ekstraktima tropa grožđa (CS 2016.) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO (**a,c**) i PC, CS, PE, HG, TG (**b,d**)



**Slika 4.12.** Bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) ferulinske kiseline (**a,b**) u ekstraktima tropa grožđa (CS 2016.) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO (**a**) i PC, CS, PE, HG, TG (**b**)

Hidroksicimetne kiseline čine važnu skupinu prirodnih fenolnih spojeva od kojih su najzastupljenije *p*-kumarinska kiselina, kafeinska kiselina, ferulinska kiselina i sinapinska kiselina. Njihova antioksidativna, protuupalna i antimikrobna svojstva čine ih vrlo učinkovitim u prevenciji raznih bolesti. Pridonose okusu, boji, nutritivnoj vrijednosti te imaju važnu ulogu u raznim biološkim procesima u ljudskom tijelu (Sova i Saso, 2020).

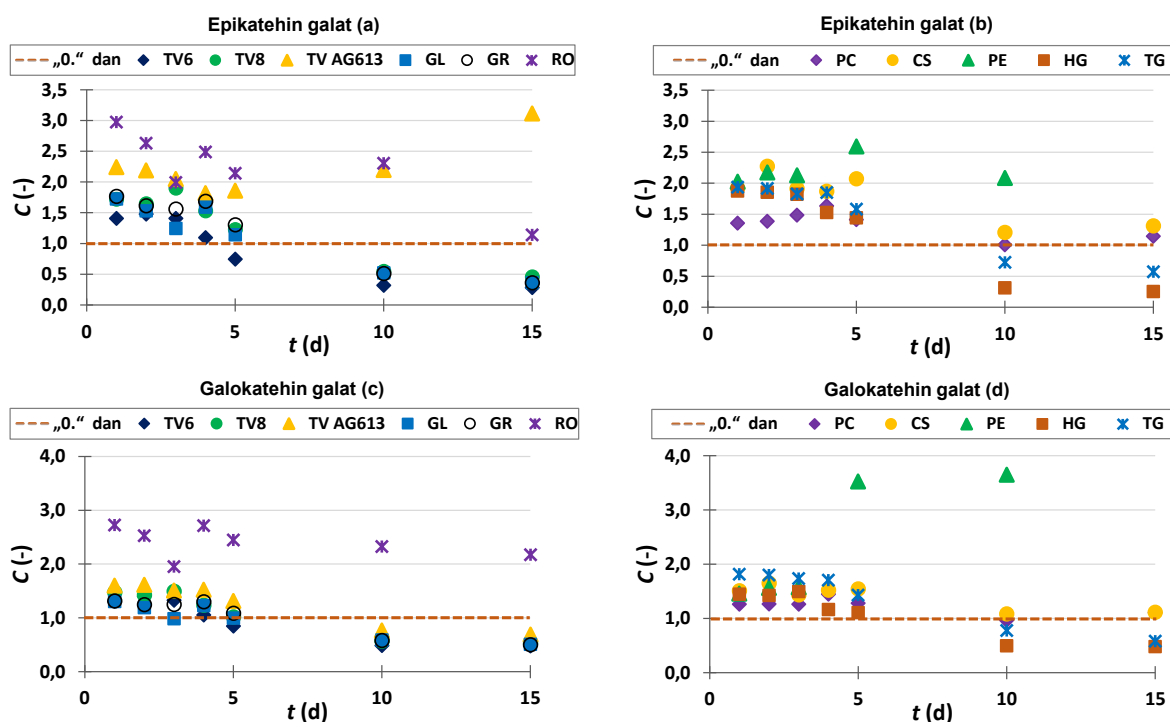
**Slika 4.11.a,b** prikazuje značajno povećanje ekstrakcijskog prinosa *o*-kumarinske kiseline nakon biološke obrade tropa grožđa s RO, TV AG613, HG i PE, s najznačajnijim porastom (za 7,5 puta) zabilježenim nakon 15. dana fermentacije s TV AG613 (**Tablica 3.**). SSF tropa grožđa pomoću RO pokazala je najbolji utjecaj na povećanje ekstraktibilnosti *p*-kumarinske kiseline, čiji se udio povećao s  $8,76 \pm 0,70 \mu\text{g/g}_{\text{s.t}}$  na  $14,63 \pm 0,16 \mu\text{g/g}_{\text{s.t}}$  (1,7 puta) nakon prvog dana fermentacije (**Slika 4.11.c**, **Tablica 3.**). SSF s TV AG613 rezultirala je povećanjem udjela *p*-kumarinske kiseline nakon prvog dana, SSF s GR tijekom prvih 5 dana (**Slika 4.11.c**), a s HG i PE nakon 10. dana (**Slika 4.11.d**), dok SSF s ostalim filamentoznim gljivama nije utjecala na povećanje ekstraktibilnosti *p*-kumarinske kiseline iz tropa grožđa.

Ferulinska kiselina se smatra snažnim antioksidansom jer ima brojna farmakološka svojstva (protuupalna, antimikrobna, antikancerogena, antiaritmička, antitrombotička, antidiijabetička) (Zduńska et al., 2018). Uglavnom se primjenjuje u kozmetičkoj industriji zbog svoje zaštitne funkcije važnih komponenti koje čine strukturu kože kao što su elastin, kolagen, keratinociti i fibroblasti, a koristi se u formulacijama za njegu kože kao fotoprotektant, za zaštitu kože od fotostarenja i kao komponenta za posvjetljivanje. Također ubrzava zacjeljivanje rana, inhibira melanogenezu i potiče angiogenezu (Ingole et al., 2021; Zduńska et al., 2018). Na povećanje ekstraktibilnosti ferulinske kiseline utjecala je SSF pomoću GL i GR tijekom prvih 5 dana, te SSF s PC i CS nakon prvog dana fermentacije, kao što je vidljivo na **Slici 4.12.a,b**. Od 5. do 15. dana biološke obrade sa svih 11 filamentoznih gljiva udio ferulinske kiseline se smanjivao.

Najznačajnije povećanje prinosa ferulinske kiseline uočeno je nakon prvog dana biološke obrade tropa grožđa pomoću GL, pri čemu se njen udio povećao za 1,2 puta (**Tablica 3.**).

#### 4.2.2. Flavan-3-oli

Flavan-3-oli predstavljaju najreduciraniji oblik flavonoida i uključuju niz monomernih katehina i oligomernih ili polimernih procijanidina. Ovi spojevi imaju važnu ulogu u kvaliteti i svojstvima vina te imaju funkciju prirodnih konzervanasa. Flavan-3-oli sjemenki grožđa imaju različite biološke učinke na ljudsko zdravlje i doprinose zdravstvenim svojstvima vina (Padilla-González et al., 2022).



**Slika 4.13.** Bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) epikatehin galata (a,b) i galokatehin galata (c,d) u ekstraktima tropa grožđa (CS 2016.) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO (a,c) i PC, CS, PE, HG, TG (b,d)

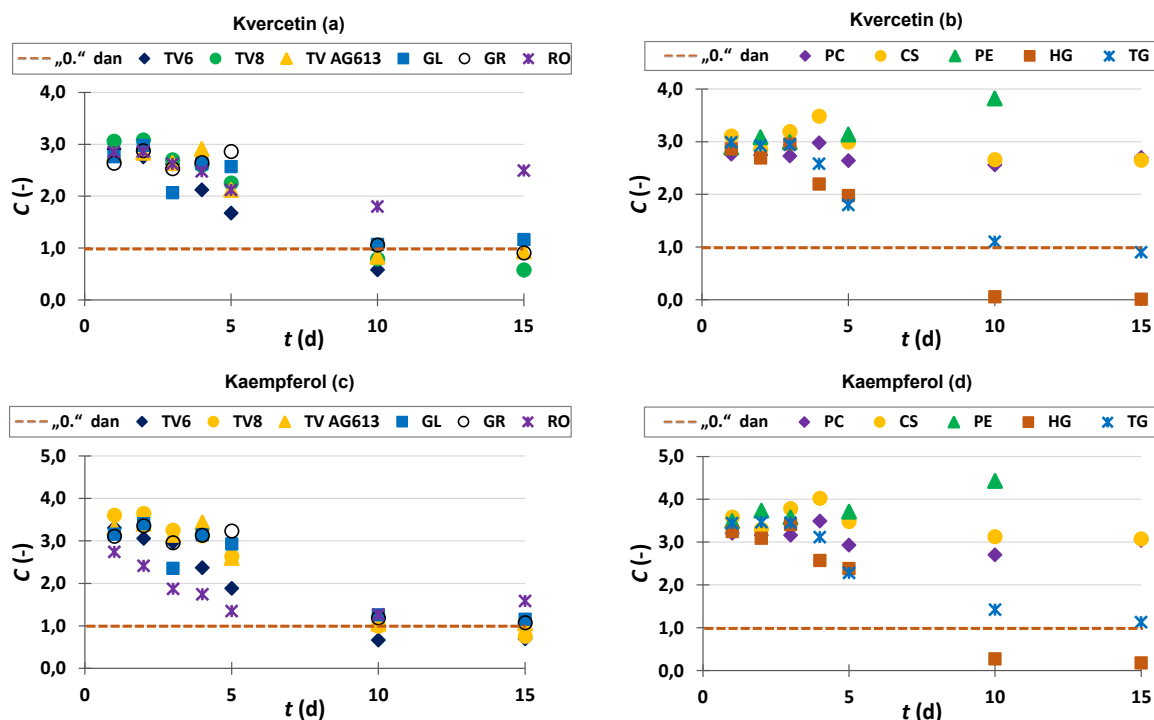
**Slika 4.13.a-d** prikazuje bezdimenzijski udio flavan-3-ola (epikatehin galat, galokatehin galat) u ekstraktima tropa grožđa prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s jedanaest filamentoznih gljiva (TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO, PC, CS, PE, HG i TG). SSF je imala pozitivan utjecaj na prinos epikatehin galata tijekom prvih 5 dana fermentacije sa svim korištenim mikroorganizmima, uz iznimku 5. dana fermentacije s TV6 kada se udio epikatehin galata smanjio u usporedbi s biološki neobrađenim uzorkom (**Slika 4.13.a,b**). Nakon 10. i 15. dana biološke obrade s TV AG613, PE, CS i PC došlo je do porasta ekstrakcijskog prinosa epikatehin galata, dok su ostale filamentozne gljive utjecale na

smanjenje njegovog udjela tijekom 10. i 15. dana biološke obrade. Najznačajniji porast udjela epikatehin galata s  $166,9 \pm 8,42 \mu\text{g/g}_{\text{s.t}}$  na  $519,13 \pm 5,20 \mu\text{g/g}_{\text{s.t}}$  (za 3,1 puta) uočen je nakon 15. dana SSF pomoću TV AG613 (**Slika 4.13.a, Tablica 3.**). U slučaju galokatehin galata, do povećanja ekstraktibilnosti došlo je biološkom obradom s gotovo svim korištenim filamentoznim gljivama tijekom prvih 5 dana fermentacije (**Slika 4.13.c,d**), a također i nakon 10. dana fermentacije s PE, kada je uočen najveći porast prinosa ovog flavan-3-ola s povećanjem od 3,7 puta u odnosu na njegov udio u biološki neobrađenom uzorku (**Slika 4.13.d, Tablica 3.**).

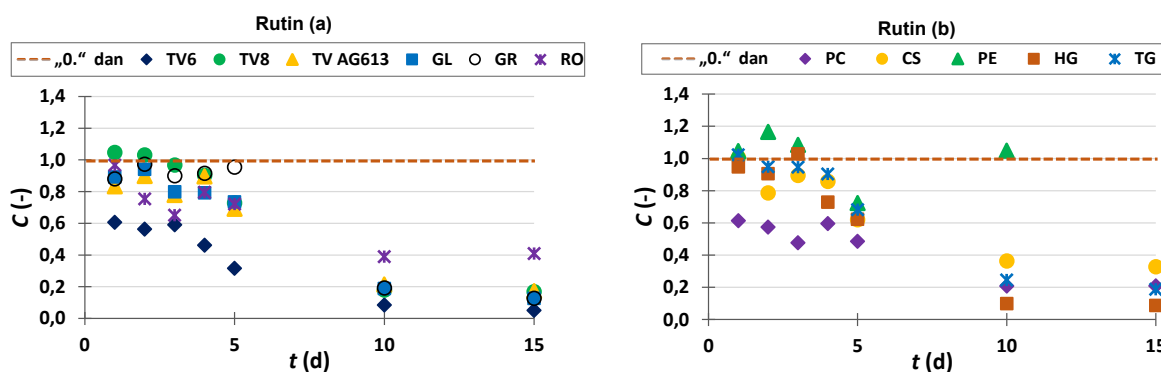
### 4.2.3. Flavonoli

S biološkog stajališta, flavonoli imaju izvanrednu sposobnost zaštite od oksidativnog stresa, čime se ograničava oksidativno oštećenje i smanjuje ozbiljnost kroničnih bolesti. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala pruža mogućnost primjene flavonola u svrhu konzerviranja hrane, produljenja roka trajanja i stabilnosti svježih prehrambenih proizvoda. Štoviše, osim hvatanja slobodnih radikala, ovi spojevi mogu regenerirati antioksidativne vitamine C i E. Flavonoli su uobičajeno prisutni u ljudskoj prehrani, u biljnom carstvu, a u izobilju su zastupljeni u voću i povrću. Najzastupljeniji flavonoli su kvercetin, kaempferol, isorhamnetin i rutin (Gervasi et al., 2022).

**Slike 4.14. i 4.15.** prikazuju bezdimenzijski udio flavonola (kvercetina, kaempferola, rutina) u ekstraktima tropa grožđa prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s jedanaest filamentoznih gljiva (TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO, PC, CS, PE, HG i TG).



**Slika 4.14.** Bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) kvercetina (a,b) i kaempferola (c,d) u ekstraktima tropa grožđa (CS 2016.) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO (a,c) i PC, CS, PE, HG, TG (b,d)



**Slika 4.15.** Bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) rutina (a,b) u ekstraktima tropa grožđa (CS 2016.) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO (a) i PC, CS, PE, HG, TG (b)

Biološka obrada tropa grožđa s TV6, TV8, TV AG613, GL i GR tijekom prvih 5 dana rezultirala je povećanjem ekstraktibilnosti kvercetina i kaempferola u odnosu na biološki neobrađeni uzorak. Nakon 10. i 15. dana fermentacije s navedenim filamentoznim gljivama udio kvercetina i kaempferola se smanjio (**Slika 4.14.a,c**). SSF s PC, CS i PE rezultirala je povećanjem prinosa ekstrakcije kvercetina (**Slika 4.14.b**) i kaempferola (**Slika 4.14.d**) tijekom svih 15 dana fermentacije u usporedbi s neobrađenim uzorkom tropa grožđa. Njihov udio raste tijekom prvih

5 dana biološke obrade pomoću HG i TG, zatim se smanjuje nakon 10. i 15. dana SSF (**Slika 4.14.b,d**). Najveći porast ekstraktibilnosti kvercetina (za 3,8 puta) i kaempferola (za 4,4 puta) uočen je nakon 10 dana biološke obrade tropa grožđa pomoću PE (**Tablica 3.**). Na povećanje ekstraktibilnosti rutina utjecaj je imala samo SSF s TV8 prvi i drugi dan fermentacije, s HG treći dan fermentacije, zatim s PE prva tri dana te deseti dan fermentacije (**Slika 4.15.a,b**). Najveći porast ekstraktibilnosti rutina za 1,2 puta u odnosu na početni neobrađeni uzorak zabilježen je nakon 2 dana biološke obrade s PE.

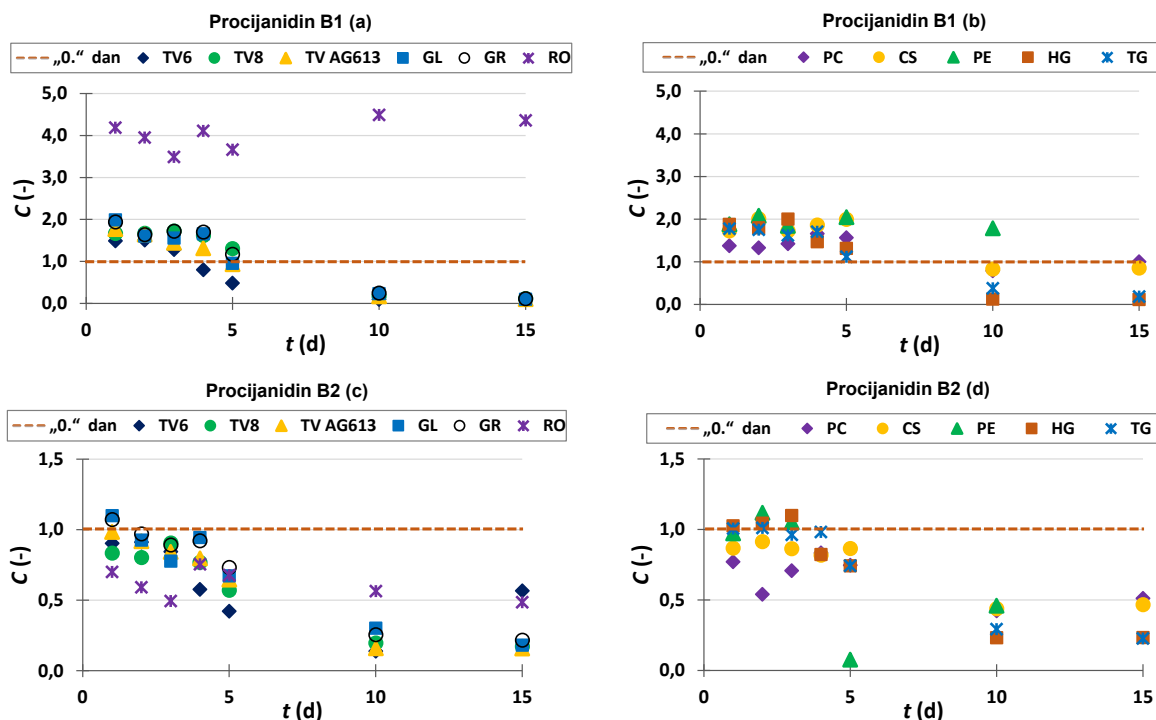
#### 4.2.4. Procijanidini

Procijanidini nastaju oksidativnom kondenzacijom jedinica (+)-katehina i/ili (-)-epikatehina. Najzastupljeniji dimer procijanidina u sjemenkama grožđa je procijanidin B2 (Padilla-González et al., 2022). Procijanidine karakterizira antioksidativno djelovanje i sposobnost specifičnog vezanja proteina i regulacije staničnih signalnih puteva, stoga su učinkoviti u prevenciji raznih bolesti kao što su rak, upale, kardiovaskularne bolesti, dijabetes i autoimune bolesti (Tang et al., 2021).

**Slika 4.16.a-d** prikazuje bezdimenzijski udio procijanidina (procijanidin B1, procijanidin B2) u ekstraktima tropa grožđa prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s 11 filamentoznih gljiva (TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO, PC, CS, PE, HG i TG).

Biološka obrada s RO najviše je utjecala na povećanje ekstraktibilnosti procijanidina B1 tijekom svih 15 dana SSF (**Slika 4.16.a**). Nakon deset dana fermentacije njegov udio iznosio je  $1368,26 \pm 18,19 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ , što je 4,5 puta više od udjela u početnom neobrađenom uzorku ( $304,27 \pm 0,37 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ ) (**Tablica 3.**).

U slučaju procijanidina B2, biološka obrada tropa grožđa s GL i GR nakon prvog dana fermentacije (**Slika 4.16.c**) i biološka obrada s PE i HG tijekom prva tri dana fermentacije (**Slika 4.16.d**) pozitivno su utjecale na ekstraktibilnost procijanidina B2. Najveći porast njegovog udjela uočen je nakon 2. dana fermentacije s PE (**Slika 4.16.d**), kada se povećao za 1,1 puta u odnosu na početni uzorak (**Tablica 3.**). U preostalim danima fermentacije udio procijanidina B2 se smanjivao, kao i u biološkoj obradi s ostalim mikroorganizmima tijekom svih 15 dana fermentacije.



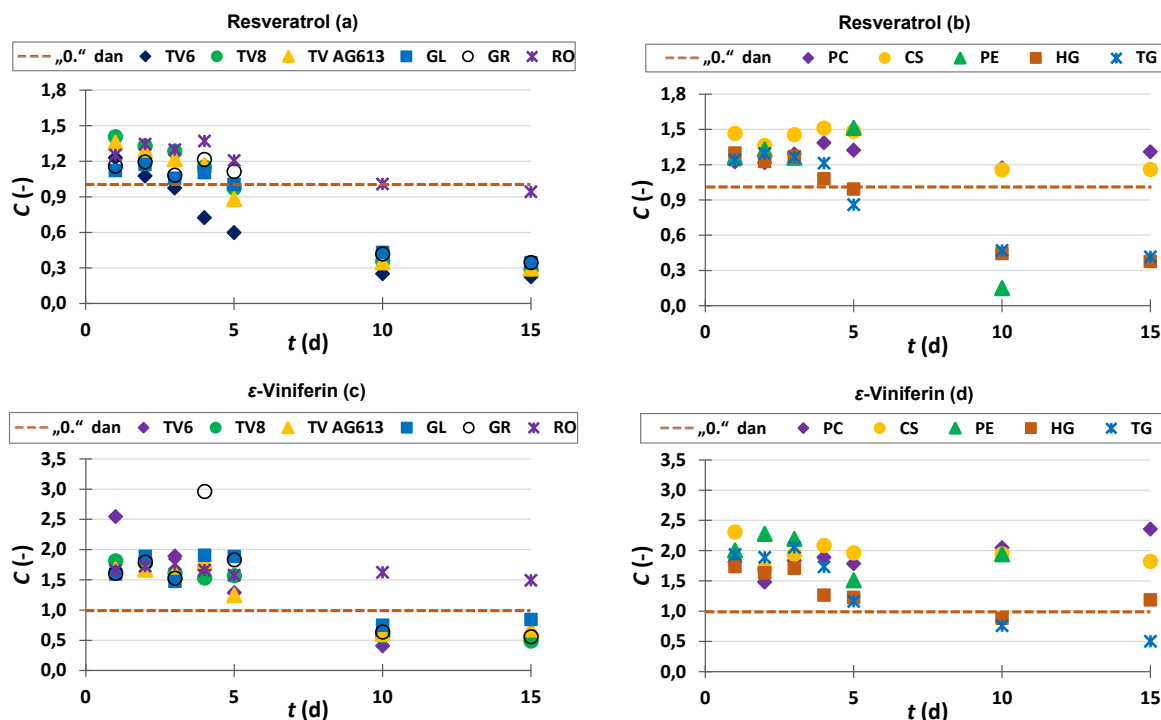
**Slika 4.16.** Bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) procijanidina B1 (a,b) i procijanidina B2 (c,d) u ekstraktima tropa grožđa (CS 2016.) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO (a,c) i PC, CS, PE, HG, TG (b,d)

#### 4.2.5. Stilbeni

Stilbeni nastaju iz fenilpropanoidnih spojeva, a grožđe i crno vino jedni su od najvažnijih izvora stilbena u ljudskoj prehrani. Imaju brojne biološke aktivnosti poput antioksidativnog, neuroprotektivnog i antitumorskog djelovanja, stoga su korisni za ljudsko zdravlje. U novijim istraživanjima navode se kao potencijalni agensi protiv pretilosti. Između ostalog, mogu pospješiti lipolizu,  $\beta$ -oksidaciju, termogenezu i mitohondrijsku biogenezu. Među uobičajenim stilbenima, resveratrol je najpoznatiji spoj (Benbougerra et al., 2021).

**Slika 4.17.a-d** prikazuje bezdimenzijski udio stilbena (resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin) u ekstraktima tropa grožđa prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s 11 filamentoznih gljiva (TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO, PC, CS, PE, HG i TG).





**Slika 4.17.** Bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) resveratrola (a,b) i  $\epsilon$ -viniferina (c,d) u ekstraktima tropa grožđa (CS 2016.) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 15. dana biološke obrade s TV6, TV8, TV AG613, GL, GR, RO (a,c) i PC, CS, PE, HG, TG (b,d)

Nakon 5. dana biološke obrade tropa grožđa pomoću PE uočen je najznačajniji porast prinosa resveratrola, kada je njegov udio iznosio  $69,65 \pm 0,97 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ , što je 1,5 puta više od udjela resveratrola u početnom neobrađenom uzorku ( $46,07 \pm 3,48 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ ) (**Slika 4.17.b, Tablica 3.**). Oksidativnom ciklizacijom resveratrola nastaje njegov dimer,  $\epsilon$ -viniferin, koji ima snažno djelovanje protiv upala i oksidativnog stresa te se smatra obećavajućim prirodnim spojem koji bi se mogao koristiti u proizvodnji funkcionalne hrane za prevenciju upalnih procesa i bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom (Beaumont et al., 2022). Tijekom prvih pet dana biološke obrade tropa grožđa sa svih 11 filamentoznih gljiva porastao je udio  $\epsilon$ -viniferina. SSF pomoću GR imala je najveći utjecaj na povećanje ekstraktibilnosti  $\epsilon$ -viniferina, sa  $17,52 \pm 1,64 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$  na  $51,80 \pm 0,35 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ , nakon 4. dana fermentacije (**Slika 4.17.c, Tablica 3.**). Povećanje prinosa je uočeno i nakon 10. dana biološke obrade s RO, PC, CS, PE, te nakon 15. dana biološke obrade s RO, PC, CS i HG, dok SSF s ostalim mikroorganizmima nije imala utjecaj na povećanje prinosa  $\epsilon$ -viniferina nakon 10. i 15. dana SSF-a (**Slika 4.17. c,d**).

SSF može biti učinkovita metoda za povećanje ekstraktibilnosti fenolnih spojeva, jer tijekom ovog procesa mikroorganizmi sintetiziraju kompleksni sustav enzima uključenih u razgradnju složene strukture heterogenih supstrata kao što je trop grožđa i lignocelulozni supstrati općenito (Šelo et al., 2021). Kao posljedica enzimskog djelovanja, može doći do oslobađanja

fenolnih spojeva iz lignocelulozne strukture, što rezultira povećanjem udjela fenolnih spojeva, obično zbog hidrolitičkih enzima (Teles et al., 2019) ili do razgradnje enzimskom hidrolizom i smanjenja udjela fenolnih spojeva (Zhang et al., 2017). Međutim, da bi se dobio željeni proizvod, proces je potrebno kontrolirati te zaustaviti onog trenutka kada se proizvede željeni proizvod (Bucić-Kojić et al., 2020). Fenolni spojevi imaju snažnu biološku aktivnost, zbog čega pronalaze primjenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, a posebno važnu ulogu imaju u prevenciji raznih bolesti. Sinergistički učinak različitih bioaktivnih tvari prisutnih u tropu grožđa doprinosi njenoj boljoj biološkoj aktivnosti (Maluf et al., 2018; Muñoz-Bernal et al., 2021).

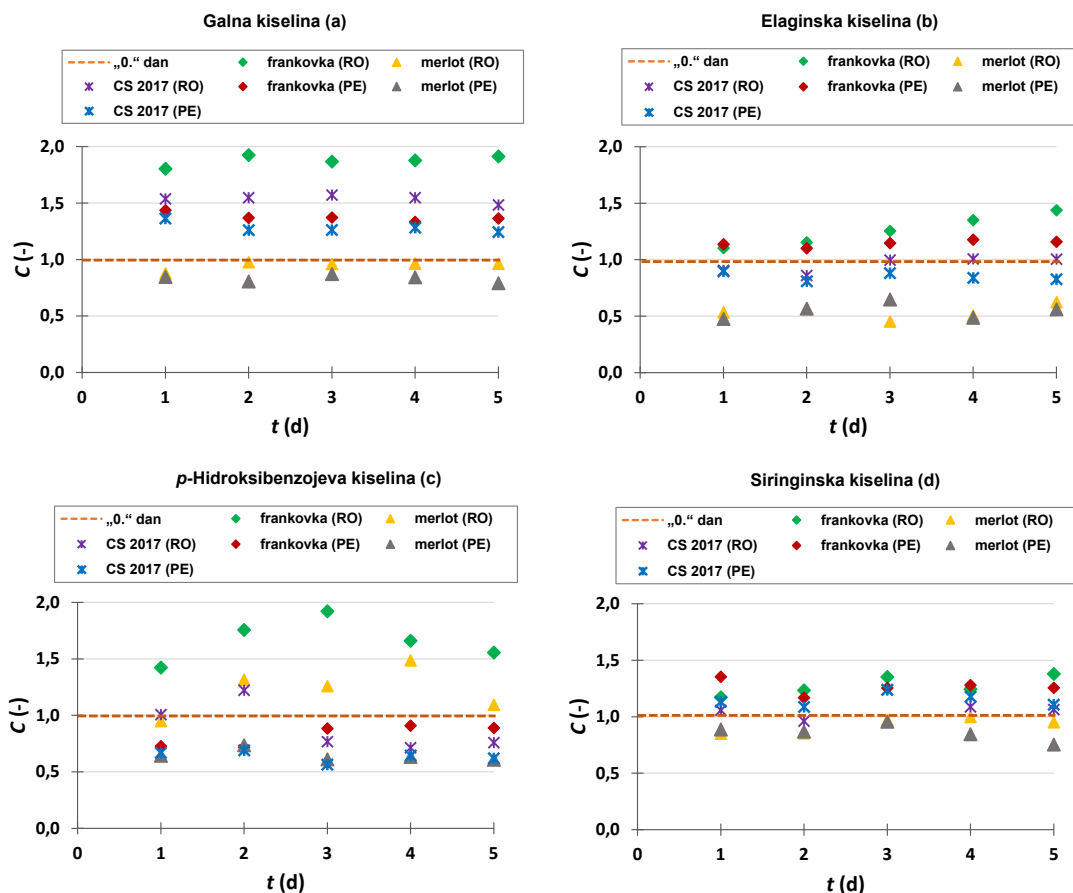
Iz prezentiranih podataka (**Tablica 3.**) vidljivo je da se biološka obrada tropa grožđa pomoću *R. oryzae* (RO) i *P. eryngii* (PE) pokazala kao najučinkovitija u pogledu povećanja prinosa većine fenolnih spojeva (sedam fenolnih spojeva kod primjene PE i pet fenolnih spojeva kod primjene RO) od ukupno 18 identificiranih fenolnih spojeva kod kojih se povećala ekstraktibilnost nakon SSF-a. Nadalje, prema rezultatima prikazanim na **Slikama 4.8. – 4.17.** vidljivo je da su se tijekom prvih 5 dana SSF odvijale najintenzivnije promjene koje su posljedično uzrokovale promjene u ekstraktibilnosti većine identificiranih fenolnih tvari.

Stoga je u cilju odabira mikoorganizam i spustrata s kojim će se provesti prijenos SSF-a u veće mjerilo (SSF u bioreaktoru s pliticama), provedena nova serija pokusa biološke obrade dodatna tri uzorka tropa grožđa (cabernet sauvignon 2017., frankovka 2017., i merlot 2020.) u SSF uvjetima u laboratorijskim staklenkama tijekom 5 dana pomoću *R. oryzae* i *P. eryngii*.

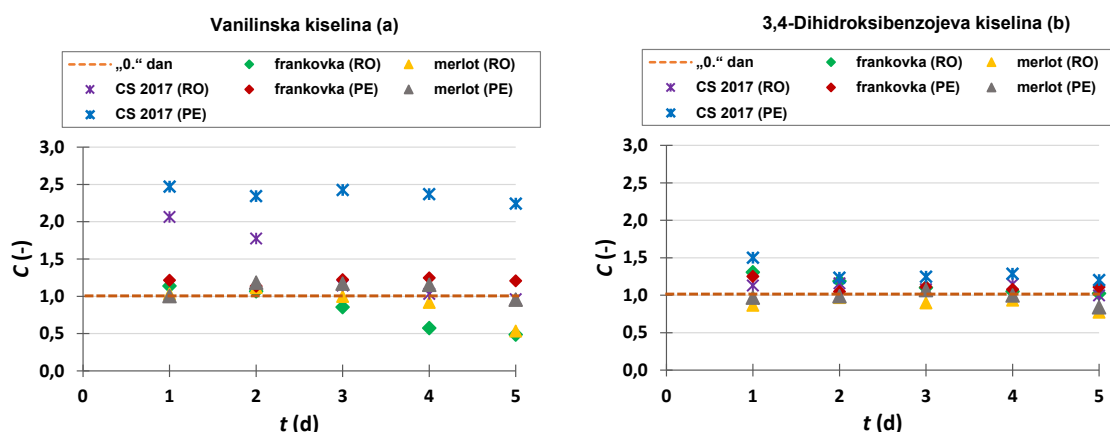
### 4.3. BIOLOŠKA OBRADA TROPA GROŽĐA POMOĆU *P. eryngii* i *R. oryzae* U LABORATORIJSKIM STAKLENKAMA

**Slike 4.18. – 4.24.** prikazuju rezultate analize pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima dobivenim prije („0.“ dan) i nakon biološke obrade (1. – 5. dan) tri različita uzorka tropa grožđa (frankovka 2017. (F 2017.), merlot 2020. (M 2020.) i cabernet sauvignon 2017. (CS 2017)) pomoću *P. eryngii* i *R. oryzae*. Radi jasnijeg prikaza i bolje ilustracije utjecaja SSF-a s *P. eryngii* i *R. oryzae* na ekstraktibilnost fenolnih spojeva iz tropa grožđa, rezultati su prikazani kao bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) hidroksibenzojevih kiselina (**Slike 4.18. i 4.19.**) hidroksicimetnih kiselina (**Slika 4.20.**), flavan-3-ola (**Slika 4.21.**), flavonola (**Slika 4.22.**), procijanidina (**Slika 4.23.**) i stilbena (**Slika 4.24.**). U analiziranim ekstraktima dobivenim prije i nakon SSF tropa grožđa identificiran je i kvantificiran 21 fenolni spoj, uz izuzetak procijanidina B2 koji nije identificiran samo u sorti frankovka. Tijekom provedbe ovog dijela istraživanja (*screeninga*), SSF nije pokazala pozitivan utjecaj u smislu povećanja ekstraktibilnosti svih identificiranih fenolnih tvari, odnosno nakon biološke obrade nije se povećavao udio

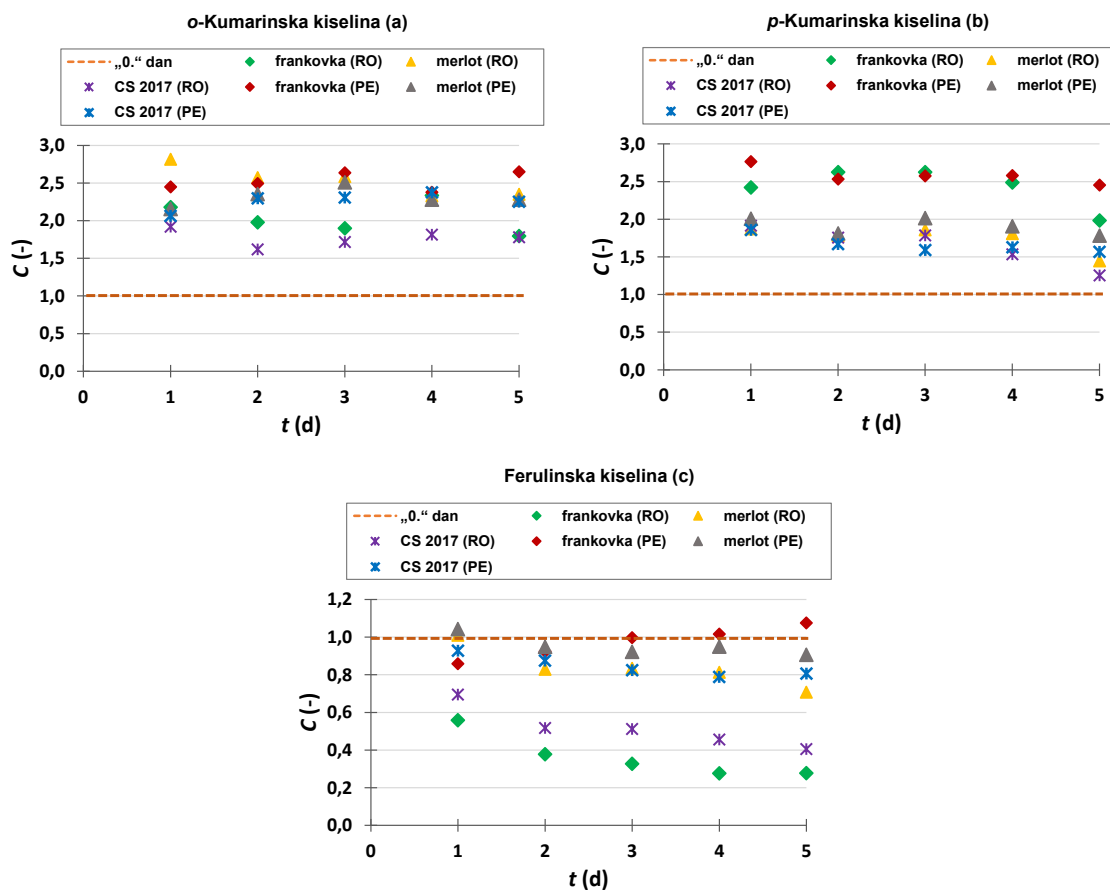
kafeinske kiseline, rutina, kaempferola i procijanidina B2 u ekstraktima tropova grožđa, stoga ti rezultati nisu prikazani u nastavku.



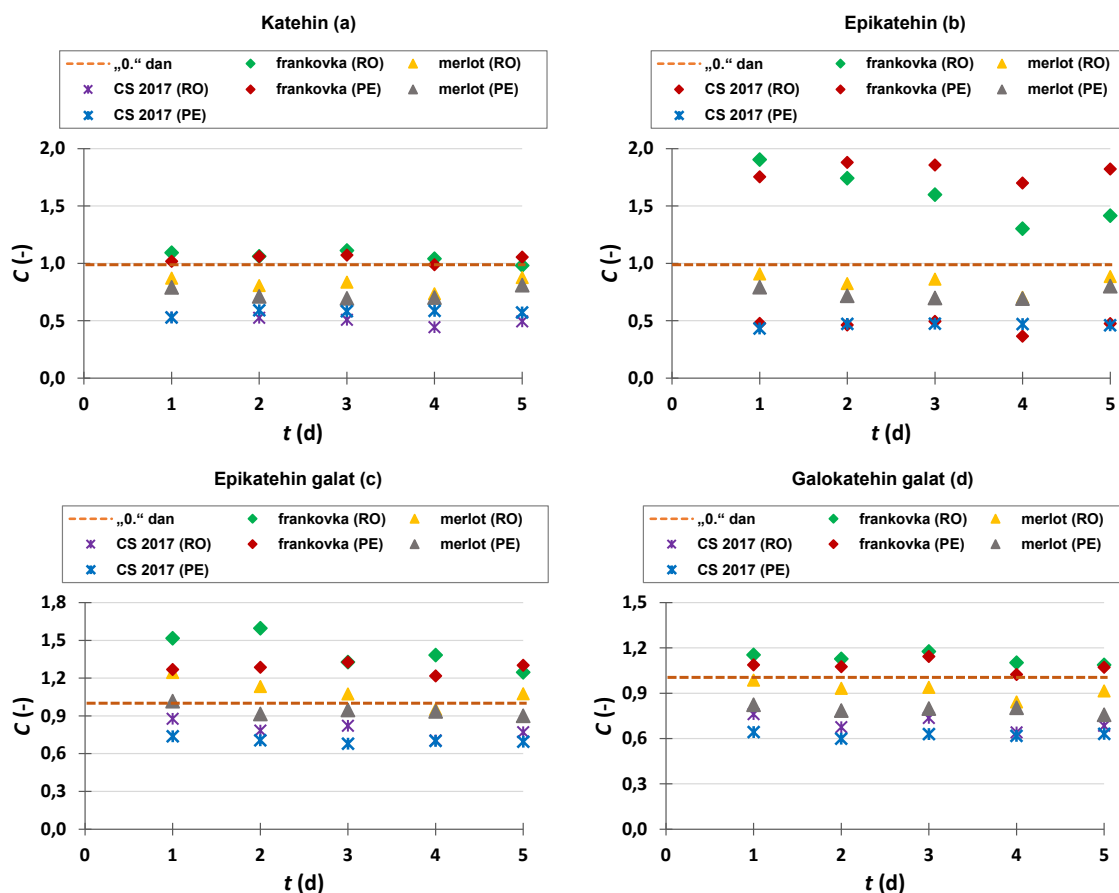
**Slika 4.18.** Bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) hidroksibenzojevih kiselina (galna (a), elaginska (b), *p*-hidroksibenzojeva (c) i siringinska kiselina (d)) u ekstraktima tropa grožđa sorte frankovka, merlot i cabernet sauvignon (CS 2017) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 5. dana biološke obrade s *P. eryngii* i *R. oryzae*



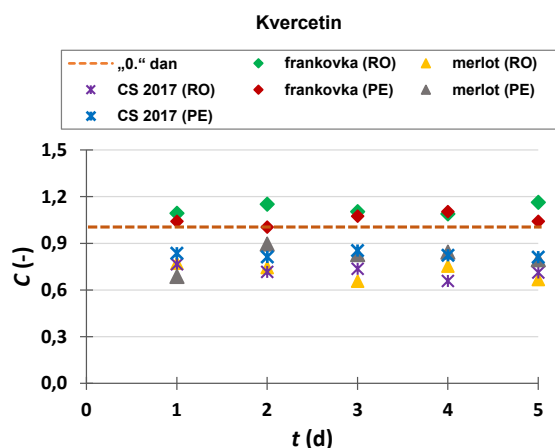
**Slika 4.19.** Bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) hidroksibenzojevih kiselina (vanilinska (a) i 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (b)) u ekstraktima tropa grožđa sorte frankovka, merlot i cabernet sauvignon (CS 2017) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 5. dana biološke obrade s *P. eryngii* i *R. oryzae*



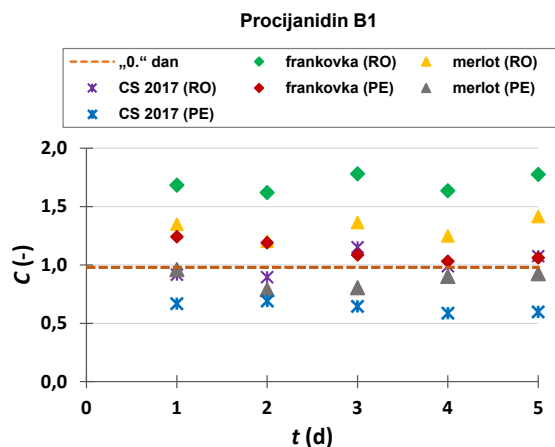
**Slika 4.20.** Bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) hidroksicimetnih kiselina (o-kumarinska (a), p-kumarinska (b) i ferulinska kiselina (c)) u ekstraktima tropa grožđa sorte frankovka, merlot i cabernet sauvignon (CS 2017) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 5. dana biološke obrade s *P. eryngii* i *R. oryzae*



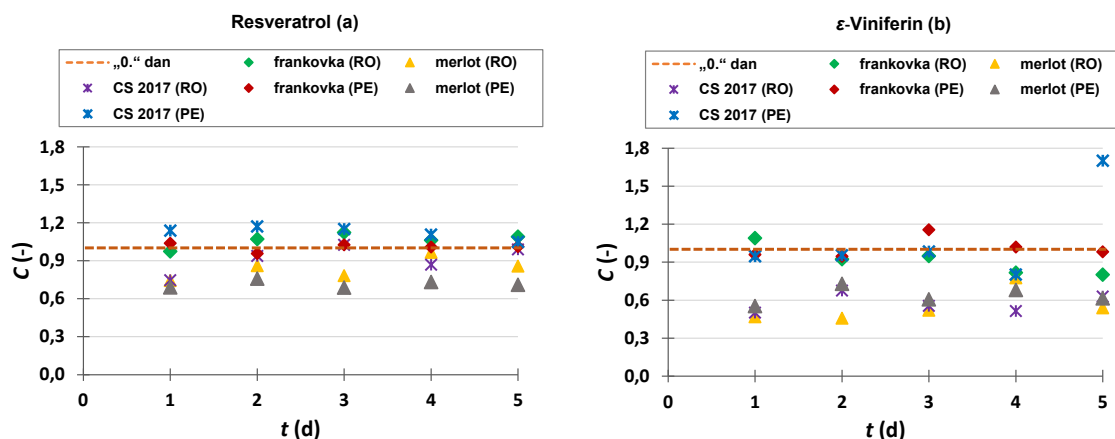
**Slika 4.21.** Bezdimezijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) flavan-3-ola (katehin (a), epikatehin (b), epikatehin galat (c), galokatehin galat (d)) u ekstraktima tropa grožđa sorte frankovka, merlot i cabernet sauvignon (CS 2017) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 5. dana biološke obrade s *P. eryngii* i *R. oryzae*



**Slika 4.22.** Bezdimezijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) flavonola (kvercetina) u ekstraktima tropa grožđa sorte frankovka, merlot i cabernet sauvignon (CS 2017) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 5. dana biološke obrade s *P. eryngii* i *R. oryzae*



**Slika 4.23.** Bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) procijanidina (procijanidin B1) u ekstraktima tropa grožđa sorte frankovka, merlot i cabernet sauvignon (CS 2017) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 5. dana biološke obrade s *P. eryngii* i *R. oryzae*



**Slika 4.24.** Bezdimenzijski udio ( $C = C_i/C_0$ ) stilbena (resveratrol (a) i  $\epsilon$ -viniferin (b)) u ekstraktima tropa grožđa sorte frankovka, merlot i cabernet sauvignon (CS 2017) prije biološke obrade („0.“ dan) i nakon 1. – 5. dana biološke obrade s *P. eryngii* i *R. oryzae*

SSF unutar eksperimentalnih uvjeta je imala pozitivan utjecaj na ekstraktibilnost 17 pojedinačnih fenolnih tvari, čiji su udjeli prije („0.“ dan,  $C_0$ ) i nakon SSF (maksimalni udio pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa zabilježen nakon određenog trajanja SSF-a s *P. eryngii* ili *R. oryzae*,  $C_{i,max.}$ ) navedeni u **Tablici 4**.

**Tablica 4.** Udio pojedinačnih fenolnih tvari u ekstraktima tropa grožđa sorte frankovka, cabernet sauvignon (CS 2017) i merlot dobivenim prije SSF („0.“ dan,  $C_0$ ) i nakon SSF (maksimalni udio pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa zabilježen nakon određenog vremena trajanja SSF-a s pojedinim mikroorganizmom,  $C_{i,max.}$ )

Pojedinačne fenolne tvari	Sorta tropa grožđa	Mikro-organizam	$t_{SSF}$ (dan)	$C_0^*$ ( $\mu\text{g/g}_{s.t.}$ )	$C_{i,max.}^*$ ( $\mu\text{g/g}_{s.t.}$ )	$p^{**}$
<b>Fenolne kiseline (hidroksibenzojeve kiseline)</b>						
Galna kiselina	frankovka	<i>R. oryzae</i>	2.	214,63 ± 6,24	415,82 ± 19,17	0,0016
Elaginska kiselina	frankovka	<i>R. oryzae</i>	5.	163,56 ± 3,70	233,87 ± 5,00	0,0034
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	frankovka	<i>R. oryzae</i>	3.	5,52 ± 0,15	10,66 ± 0,63	0,0075
Siringinska kiselina	frankovka	<i>R. oryzae</i>	5.	531,57 ± 14,41	744,12 ± 58,79	0,0346
Vanilinska kiselina	CS 2017	<i>P. eryngii</i>	1.	16,77 ± 0,22	41,90 ± 2,55	0,0030
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	CS 2017	<i>P. eryngii</i>	1.	114,70 ± 3,56	170,77 ± 16,01	0,0379
<b>Fenolne kiseline (hidroksicimetne kiseline)</b>						
Ferulinska kiselina	frankovka	<i>P. eryngii</i>	5.	8,65 ± 0,18	9,36 ± 0,87	0,6484
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	merlot	<i>R. oryzae</i>	1.	8,72 ± 0,62	24,61 ± 1,58	0,0074
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	frankovka	<i>P. eryngii</i>	1.	5,99 ± 0,19	16,47 ± 0,32	0,0006
<b>Flavan-3-oli</b>						
Katehin	frankovka	<i>R. oryzae</i>	1.	1394,48 ± 3,06	1525,74 ± 45,23	0,0328
Epikatehin	frankovka	<i>R. oryzae</i>	1.	527,76 ± 5,82	1003,54 ± 7,21	0,0000
Epikatehin galat	frankovka	<i>R. oryzae</i>	2.	217,96 ± 11,27	341,94 ± 33,76	0,0382
Galokatehin galat	frankovka	<i>R. oryzae</i>	3.	504,72 ± 10,78	596,92 ± 15,36	0,0227
<b>Flavonoli</b>						
Kvercetin	frankovka	<i>R. oryzae</i>	5.	203,62 ± 1,95	239,58 ± 9,85	0,0264
<b>Procijanidini</b>						
Procijanidin B1	frankovka	<i>R. oryzae</i>	3.	713,60 ± 14,37	1266,96 ± 24,91	0,0015
<b>Stilbeni</b>						
Resveratrol	CS 2017	<i>P. eryngii</i>	3.	19,81 ± 0,12	23,14 ± 1,23	0,0429
$\epsilon$ -Viniferin	CS 2017	<i>P. eryngii</i>	5.	24,02 ± 0,29	47,64 ± 23,38	0,2223

\* Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ( $n = 3$ ) ± SD.

\*\* Za usporedbu srednjih vrijednosti koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva između „0.“ dana (biološki neobrađen uzorak tropa grožđa) i dana fermentacije kada je postignut maksimalni prinos pojedinačnih fenolnih spojeva korišten je Studentov t-test za zavisne uzorke uz stupanj sigurnosti 95 % (crveno obojene vrijednosti - statistički značajna razlika uz  $p < 0,05$ ).

*Screeningom* profila fenolnih tvari iz tri različite sorte tropa grožđa prije i nakon biološke obrade pomoću *P. eryngii* i *R. oryzae* utvrđeno je da je SSF s *R. oryzae* koristeći trop grožđa sorte frankovka kao supstrat utjecala na povećanje ekstraktibilnosti najvećeg broja fenolnih tvari te je za 10 od ukupno 17 kvantificiranih fenolnih spojeva postignuto maksimalno povećanje ekstrakcijskog prinosa za 1,1 – 1,9 puta nakon određenog vremena trajanja fermentacije

(**Tablica 4.**). Također, SSF provedena uz primjenu *R. oryzae* koristeći trop grožđa sorte merlot kao supstrat imala je najbolji utjecaj na ekstraktibilnost *o*-kumarinske kiseline s povećanjem za 2,8 puta u odnosu na njen udio u biološki neobrađenom uzorku. SSF provedena uz primjenu *P. eryngii* utjecala je na povećanje ekstraktibilnosti 6 pojedinačnih fenolnih spojeva čiji je prinos porastao za 1,1 – 2,8 puta nakon određenog vremena trajanja fermentacije. Nadalje, uzorak tropa grožđa sorte frankovka (berba 2017.) u ovom istraživanju pokazao se kao najpogodniji supstrat za primjenu u SSF-u u svrhu proizvodnje većine identificiranih fenolnih spojeva.

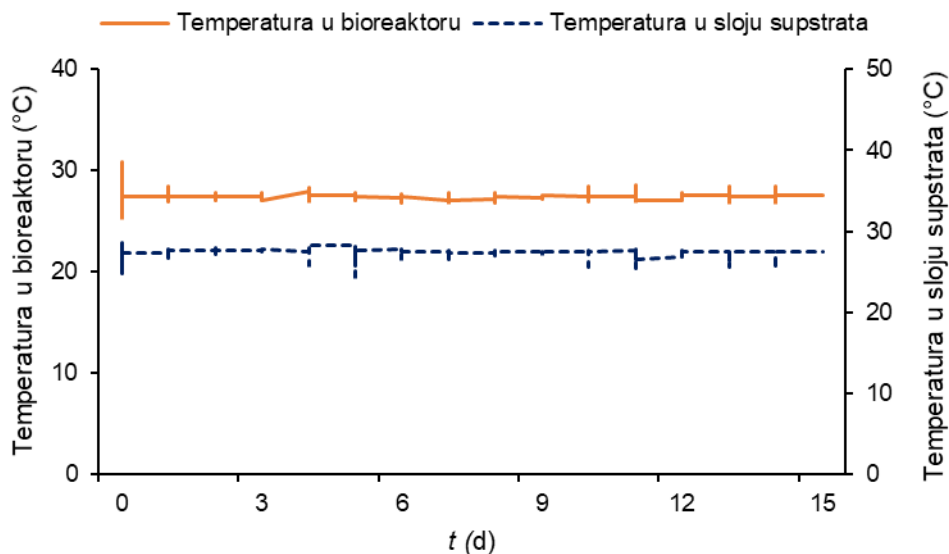
#### 4.4. BIOLOŠKA OBRADA TROPA GROŽĐA POMOĆU *R. oryzae* - UVEĆANJE MJERILA U BIOREAKTORU S PLITICAMA

Na temelju provedenog *screeninga* profila pojedinačnih fenolnih tvari u biološki obrađenom tropu grožđa s 11 mikroorganizama prikazanog u poglavlju 4.2., te usporedbe SSF-a pomoću *P. eryngii* i *R. oryzae* na tri različita uzorka tropa grožđa opisane u poglavlju 4.3., filamentozna gljiva *R. oryzae* je odabrana kao potencijalno najučinkovitiji mikroorganizam za povećanje ekstrakcijskog prinosa većine indentificiranih fenolnih spojeva iz tropa grožđa uslijed njegove biološke obrade u SSF uvjetima. Stoga je *R. oryzae* korištena kao radni mikroorganizam za uzgoj na tropu grožđa sorte frankovka (berba 2017.) u uvjetima SSF tijekom 1. – 5., 10. i 15. dana radi ispitivanja mogućnosti uvećanja mjerila i razvoja procesa proizvodnje ekstrakata obogaćenih fenolnim spojevima iz biološki obrađenog tropa grožđa u biorekatoru s pliticama.

U ovom poglavlju bit će usporedno prikazani rezultati (kemijski sastav, koncentracija biomase, prinos ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva, antioksidacijska aktivnost, aktivnost lignolitičkih i hidrolitičkih enzima te njihova korelacija s pojedinačnim fenolnim spojevima iz tropa grožđa) ostvareni nakon eksperimenata provedenih u laboratorijskim staklenkama i biorekatoru s pliticama.

U biorekatoru s pliticama tijekom SSF procesa mjerena je temperatura unutar bioreaktora i unutar sloja supstrata pomoću temperaturnih sondi. Temperatura u biorekatoru kretala se u intervalu od 26,7 °C do 28,0 °C, a u sredini sloja supstrata od 26,8 °C do 28,3 °C. Kao što se može vidjeti na **Slici 4.25.**, temperatura tijekom procesa SSF je bila ujednačena, odnosno nije dolazilo do značajnije fluktuacije temperature, osim što je periodičko uzorkovanje u razmacima od 24 sata utjecalo na privremeni pad temperature do 25,4 °C unutar bioreaktora i do 25,6 °C u sredini sloja supstrata.





**Slika 4.25.** Temperature u bioreaktoru s pliticama i sloju supstrata na plitici tijekom SSF-a

#### 4.4.1. Kemijski sastav

Kao što je spomenuto u teorijskom dijelu ovoga rada, trop grožđa je heterogena mješavina sjemenki, kožice, pulpe i peteljki. Prema literaturi, sjemenke grožđa sadrže oko 42,7 %<sub>s.t.</sub> vlakana, 13,1 – 19,6 %<sub>s.t.</sub> lipida, 3,7 – 13,0 %<sub>s.t.</sub> ukupnih polifenola, 38,7 %<sub>s.t.</sub> tanina i 19,3 %<sub>s.t.</sub> šećera. Kožica tropa grožđa sadrži 17,3 – 56,3 %<sub>s.t.</sub> vlakana, 18,8 %<sub>s.t.</sub> proteina, 8,5 – 19,9 %<sub>s.t.</sub> tanina, 1,3 – 77,53 %<sub>s.t.</sub> šećera i 1 – 3,6 %<sub>s.t.</sub> ukupnih polifenola. Peteljke sadrže oko 77,2 %<sub>s.t.</sub> vlakana, 6,4 – 15,9 %<sub>s.t.</sub> tanina, 6,1 – 7,3 %<sub>s.t.</sub> proteina, 9,6 – 52,9 %<sub>s.t.</sub> šećera i 5,8 %<sub>s.t.</sub> ukupnih polifenola (Bucić-Kojić et al., 2017). Kemijski sastav početnog uzorka tropa grožđa koji se koristi kao supstrat u SSF-u ima značajan utjecaj na cjelokupni SSF proces, budući da udio polisaharida i drugih komponenti zastupljenih u supstratu uvelike utječu na rast primijenjenog mikroorganizama, a posljedično i na proizvodnju enzima tijekom SSF-a, te će rast i metabolizam mikroorganizama u konačnici imati utjecaja na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz tropa grožđa.

Prije („0.“ dan) i nakon biološke obrade (nakon 5., 10. i 15. dana) tropa grožđa u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama analiziran je njegov kemijski sastav kako bi se utvrdio utjecaj SSF-a pomoću *R. oryzae* na promjenu kemijskog sastava i udio fenolnih tvari u tropu grožđa sorte frankovka. Rezultati analize kemijskog sastava prikazani su u **Tablici 5**.

Udio frakcija lignina, celuloze i hemiceluloze izračunat je pomoću NDF-a, ADF-a i ADL-a, kao što je navedeno u potpoglavlju „*Određivanje udjela neutralnih detergent vlakana (NDF), kiselih detergent vlakana (ADF) i kiselog detergent lignina (ADL)*“. Nakon SSF-a tropa grožđa sorte

frankovka s *R. oryzae* uočeno je povećanje udjela celuloze s 12,90 %<sub>s.t.</sub> na 15,89 %<sub>s.t.</sub> u laboratorijskim staklenkama (15. dan) i na 14,97 %<sub>s.t.</sub> u bioreaktoru s pliticama (10. dan) (**Tablica 5.**). Udio lignina se također povećao s 31,35 %<sub>s.t.</sub> na 37,97 %<sub>s.t.</sub> u laboratorijskim staklenkama (10. dan) i na 37,11 % u bioreaktoru s pliticama (15. dan). Ovisno o supstratu, udio i sastav lignina može varirati, što rezultira različitim učincima filamentoznih gljiva na razgradnju lignocelulozne biomase. Osim toga, svaka vrsta filamentoznih gljiva pokazuje različitu selektivnost prema razgradnji lignina (Van Kuijk et al., 2015). Prema literaturnim podacima udio lignina u tropu grožđa najčešće varira u rasponu od 11,6 % do 41,3 %, ovisno o sorti grožđa (Šelo et al., 2021). Slične rezultate u istraživanjima provedenim na tropu grožđa su objavili Filippi i sur. (2021) gdje je udio lignina iznosio 34,79 %, te Teles i sur. (2019) gdje je udio lignina iznosio 40,24 %. Radi boljeg razumijevanja procesa biološke obrade i uviđanja koje su frakcije uistinu razgrađene, važno je prikazati podatke kao apsolutne vrijednosti izražene na suhu tvar uzorka. Van Kuijk i sur. (2015) su u svom istraživanju uočili porast udjela celuloze nakon biološke obrade pšenične slame, biljke *Mischantus giganteus* i piljevine pomoću gljive *Lentinula edodes* te su istaknuli da se apsolutni udio celuloze ne može povećati tijekom biološke obrade pomoću gljiva, što su i potvrdili prikazivanjem rezultata kao apsolutnih vrijednosti uzimajući u obzir gubitak suhe tvari nakon biološke obrade. Razlog povećanja udjela lignina i celuloze može biti degradacija ostalih komponenti supstrata kada gljiva najprije konzumira veliki udio lako dostupnih komponenti (Niu et al., 2018; Van Kuijk et al., 2015). Budući da nije došlo do razgradnje lignina i celuloze, za pretpostaviti je da aktivnosti sintetiziranih enzima celulaze i  $\beta$ -glukozidaze nisu bile dovoljne da kataliziraju razgradnju celuloze kao i aktivnosti lignin peroksidaze, mangan peroksidaze i lakaze da kataliziraju razgradnju lignina (rezultati enzimskih aktivnosti prikazani su u potpoglavlju 4.4.6. u Tablici 9). Zbog visokog udjela lignina trop grožđa je teško razgradiv materijal. Karakteristike koje čine lignoceluloznu biomasu otpornom na razgradnju su kristalna struktura celuloze, hemiceluloza koja se nalazi između makro- i mikro-fibrila celuloze i lignin koji je odgovoran za strukturnu stabilnost, a ispunjava prostor između hemiceluloze i prekriva celulozni skelet stvarajući lignocelulozne matrice (Tišma i sur., 2021).

**Tablica 5.** Kemijski sastav tropa grožđa (F 2017.) prije („0.“ dan) i nakon SSF (5., 10., 15. dan) pomoću *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

Komponenta	Neobrađeni trop grožđa „0.“ dan	SSF u laboratorijskim staklenkama			SSF u bioreaktoru s pliticama		
		5. dan	10. dan	15. dan	5. dan	10. dan	15. dan
Pepeo (% <sub>s.t.</sub> )	8,65 ± 0,00 c	8,19 ± 0,11 bc	8,30 ± 0,18 bc	7,59 ± 0,73 a	7,84 ± 0,14 ab	8,13 ± 0,09 abc	7,95 ± 0,08 ab
Proteini (% <sub>s.t.</sub> )	11,35 ± 0,09 e	9,09 ± 0,18 b	8,41 ± 0,10 a	9,91 ± 0,10 d	9,41 ± 0,00 c	9,56 ± 0,10 c	11,31 ± 0,10 e
Masti (% <sub>s.t.</sub> )	7,50 ± 0,20 a	9,01 ± 0,29 b	10,66 ± 0,29 d	10,77 ± 0,10 d	11,13 ± 0,47 d	11,00 ± 0,03 d	9,73 ± 0,04 c
TOC <sub>T.G.</sub> (% <sub>s.t.</sub> )	72,18 ± 0,56 a	73,03 ± 0,20 ab	73,77 ± 1,17 bc	74,75 ± 0,21 cd	74,20 ± 0,56 c	75,33 ± 0,12 d	80,14 ± 0,47 e
NDF (% <sub>s.t.</sub> )	52,81 ± 1,10 a	57,60 ± 0,64 b	58,64 ± 1,12 b	56,69 ± 0,20 b	53,16 ± 1,13 a	58,78 ± 1,44 b	61,72 ± 1,84 c
ADF (% <sub>s.t.</sub> )	44,26 ± 2,41 a	52,18 ± 0,77 bc	52,84 ± 0,66 c	50,17 ± 0,55 b	44,84 ± 1,77 a	49,66 ± 1,40 b	50,60 ± 0,94 bc
ADL / lignin (% <sub>s.t.</sub> )	31,35 ± 1,49 a	36,59 ± 0,72 cd	37,97 ± 0,33 d	34,28 ± 0,57 c	30,81 ± 0,26 a	35,45 ± 0,14 bc	37,11 ± 1,01 d
Hemiceluloza (% <sub>s.t.</sub> )	8,55 ± 1,68 c	5,42 ± 0,30 a	5,80 ± 1,72 a	6,52 ± 0,76 ab	8,32 ± 0,64 bc	9,12 ± 1,11 c	11,64 ± 0,20 d
Celuloza (% <sub>s.t.</sub> )	12,90 ± 1,70 a	15,58 ± 0,05 bc	14,87 ± 0,27 bc	15,89 ± 0,01 c	14,03 ± 1,58 ab	14,97 ± 0,57 bc	13,96 ± 0,55 ab
Saharozna (mg/g <sub>s.t.</sub> )	12,04 ± 0,27 e	6,21 ± 0,03 d	4,77 ± 0,03 e	4,28 ± 0,02 b	2,88 ± 0,09 a	4,40 ± 0,03 b	4,88 ± 0,14 c
Glukoza (mg/g <sub>s.t.</sub> )	7,01 ± 0,29 e	1,63 ± 0,04 b	2,13 ± 0,07 c	0,78 ± 0,49 a	1,98 ± 0,04 bc	2,64 ± 0,11 d	2,14 ± 0,16 c
Fruktoza (mg/g <sub>s.t.</sub> )	1,50 ± 0,12 d	0,21 ± 0,02 bc	0,07 ± 0,01 a	0,15 ± 0,01 ab	0,30 ± 0,01 c	0,18 ± 0,01 b	0,19 ± 0,07 b
RŠ (mg <sub>GLUKOZE</sub> /g <sub>s.t.</sub> )	30,00 ± 0,76 g	21,93 ± 0,20 f	18,77 ± 0,19 d	13,96 ± 0,01 c	19,78 ± 0,41 e	13,08 ± 0,37 b	9,19 ± 0,41 a
TOC <sub>E</sub> (mg/g <sub>s.t.</sub> )	79,25 ± 7,15 d	49,65 ± 1,30 b	45,27 ± 1,13 b	30,54 ± 1,18 a	63,78 ± 1,40 c	44,90 ± 0,47 b	26,50 ± 0,20 a
TN (mg/g <sub>s.t.</sub> )	1,45 ± 0,00 e	0,85 ± 0,02 d	0,72 ± 0,02 c	0,41 ± 0,04 a	0,90 ± 0,02 d	0,66 ± 0,03 b	0,36 ± 0,04 a

Svi rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (n = 3) ± SD. Vrijednosti u istom redu označene različitim malim slovima abecede međusobno su statistički značajno različite (p < 0,05, post-hoc Duncanov test višestrukih raspona), slovom „a“ označeni su uzorci koji pripadaju populaciji s najnižom srednjom vrijednosti pojedine komponente. TOC<sub>T.G.</sub> – ukupni organski ugljik u tropu grožđa, NDF – neutralna detergent vlakna, ADF – kisela detergent vlakna, ADL – kiseli detergent lignin, RŠ – reducirajući šećeri, TOC<sub>E</sub> – ukupni organski ugljik u ekstraktu, TN – ukupni dušik.

Prisutnost lignina otežava pristup celulozi i hemicelulozi. Stoga se lignocelulozna biomasa mora prethodno obraditi kako bi se mogla dalje koristiti za dobivanje željenih proizvoda, npr. pretvorbom celuloze i hemiceluloze u jednostavne šećere i njihovom fermentacijom za proizvodnju biogoriva ili za proizvodnju drugih visokovrijednih proizvoda, uključujući bioaktivne fenolne spojevi (Leite et al., 2019; Teles et al., 2019).

U **Tablici 5.** vidljivo je smanjenje udjela hemiceluloze nakon biološke obrade tropa grožđa pomoću *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama u odnosu na njen udio u početnom uzorku („0.“ dan), što može biti posljedica djelovanja hidrolitičkih enzima poput ksilanaza koje djeluju na razgradnju ksilana, glavne jedinice hemiceluloze. Međutim, u procesu provedenom u bioreaktoru s pliticama, udio hemiceluloze se neznatno smanjio nakon 5. dana fermentacije, nakon čega je rastao sve do 15. dana SSF-a, kada je zabilježen veći udio hemiceluloze nego u početnom uzorku. Uzrok tome može biti heterogeni sastav tropa grožđa i različit kemijski sastav svakog pojedinog sastojka tropa grožđa (sjemenke, kožica, peteljke) koji uvelike utječe na rast radnog mikroorganizma.

Analizom pojedinačnih šećera u ekstraktima tropa grožđa sorte frankovka prije i nakon SSF-a s *R. oryzae* kvantificirani su saharoza, glukoza i fruktoza od ukupno 13 analiziranih standarda šećera navedenih u potpoglavlju „*Kemikalije*“. Udio saharoze, glukoze i fruktoze se smanjivao s trajanjem SSF-a pomoću *R. oryzae* zato što filamentozne gljive koriste monosaharide i disaharide iz supstrata kao izvor energije za svoj rast i razvoj. Analiza reducirajućih šećera u ekstraktima tropa grožđa također prati trend smanjenja pri čemu se njihov udio sa  $30,00 \pm 0,76$  mg<sub>GLUKOZE/g<sub>s.t.</sub></sub> („0.“ dan) smanjio na  $13,96 \pm 0,01$  mg<sub>GLUKOZE/g<sub>s.t.</sub></sub> u laboratorijskim staklenkama i na  $9,19 \pm 0,41$  mg<sub>GLUKOZE/g<sub>s.t.</sub></sub> u bioreaktoru s pliticama nakon 15. dana SSF-a.

Budući da je filamentozna gljiva *R. oryzae* imala dostupne hranjive tvari iz supstrata za svoj rast, nije došla u fazu kada mora cijepati složene molekule na jednostavnije (kada dođe do nedostatka nutrijenata) kako bi došla do hranjivih tvari potrebnih za svoj razvoj, što se može povezati i sa time da se udio složenih komponenti (lignina i celuloze) nije smanjivao tijekom oba procesa. Stoga, ukoliko bi se željela postići bolja razgradnja složenih molekula i oslobađanje jednostavnih šećera iz lignocelulozne strukture te bolja proizvodnja sekundarnih metabolita, potrebno bi bilo produžiti trajanje procesa SSF.

Kao što je vidljivo u **Tablici 5.**, udio pepela nakon SSF-a se također smanjio, za 12 % u laboratorijskim staklenkama i za 8 % u bioreaktoru s pliticama nakon 15. dana fermentacije, što prema Mushollaeni i Tantalu (2020) može biti pokazatelj da mikroorganizam koristi neke mineralne tvari poput Fe, Na, Mg, Zn i K za svoj rast tijekom fermentacije. Ovo razmišljanje može se primijeniti i u ovom istraživanju s obzirom da je nakon 15. dana SSF-a zabilježeno smanjenje udjela pojedinih elemenata (P, K, Fe, Pb i As) u tropu grožđa (**Tablica 6.**).

Udio proteina u oba procesa se smanjivao do 10. dana fermentacije, a 15. dan je uočen porast tijekom SSF-a u laboratorijskim staklenkama, međutim vrijednost je i dalje bila niža od udjela proteina u početnom biološki neobrađenom uzorku („0.“ dan), dok je kod uzoraka obrađivanih u biorektoru udio proteina nakon 15. dana SSF-a dostigao početnu vrijednost. U **Tablici 5.** je vidljivo i smanjenje TN-a tijekom fermentacije što se također može povezati s metabolizmom mikroorganizma. Trop grožđa sadrži polimerne izvore ugljika, poput polisaharida, i polimerne izvore dušika, poput proteina za čije je iskorištavanje potrebna prisutnost hidrolitičkih enzima. Mikroorganizmi se prvenstveno prilagođavaju iskorištavanju lako metabolizirajućeg oblika dušika i ugljika koji su dostupni u određenom trenutku, dok istovremeno potiskuju korištenje drugih izvora sve dok se primarni izvori ne potroše pri čemu blokiraju sintezu enzima uključenih u razgradnju drugih izvora ugljika i energije (Singh i Khajuria, 2019).

Rezultati TOC-a prikazani u **Tablici 5.** ukazuju na potrošnju organskog ugljika od strane mikroorganizma tijekom procesa SSF. Štoviše, ugljik se tijekom SSF procesa kontinuirano troši, ali i oslobađa, što se vidi i po rezultatima TOC-a dobivenim analizom čvrstih uzoraka nakon SSF-a, gdje se udio  $TOC_{T.G.}$  nakon SSF-a u laboratorijskim staklenkama kretao u rasponu  $72,18 \pm 0,56 \%_{s.t.}$  –  $74,75 \pm 0,21 \%_{s.t.}$  te u biorektoru s pliticama u rasponu  $72,18 \pm 0,56 \%_{s.t.}$  –  $80,14 \pm 0,47 \%_{s.t.}$ . Analizom čvrstih uzoraka tropa grožđa prije i nakon SSF-a nije dokazana prisutnost IC-a te je stoga TOC jednak TC-u budući da se vrijednost TOC-a izračunava iz razlike TC-a i IC-a. Ugljik se tijekom procesa SSF oslobađa primjerice u obliku glukoze uslijed djelovanja hidrolitičkih enzima, posebice celulaza (Bastos i Ribeiro, 2020; Yu et al., 2021). S obzirom na dostupnost šećera u supstratu, primjerice saharoze koja predstavlja jedan od glavnih izvora ugljika ( $12,04 \pm 0,27 \text{ mg/g}_{s.t.}$ , „0.“ dan) te s obzirom na visoke vrijednosti  $TOC_E$  ( $79,25 \pm 7,15 \text{ mg/g}_{s.t.}$ , „0.“ dan) koje prati trend smanjenja reducirajućih šećera do kraja fermentacije, može se pretpostaviti da su šećeri zastupljeni u početnom uzorku tropa grožđa predstavljali glavni izvor ugljika za rast mikroorganizma te mikroorganizam nije imao „potrebu“ razgrađivati složene lignolitičke strukture kako bi došao do izvora ugljika. Za pretpostaviti je da bi do značajnije razgradnje lignolitičke strukture došlo produžavanjem vremena provedbe SSF-a (Costa-Silva et al., 2022).

Što se tiče TN-a, u **Tablici 5.** je vidljivo da je njegov udio u biološki neobrađenom uzorku iznosio  $1,45 \pm 0,00 \text{ mg/g}_{s.t.}$  te da se kontinuirano smanjivao tijekom SSF-a u oba procesa te je nakon 15. dana fermentacije u laboratorijskim staklenkama dostigao vrijednost od 28,5 % početnog udjela, odnosno 25,1 % početnog udjela tijekom fermentacije u većem mjerilu (bioreaktor s pliticama). Ovi podaci su u skladu s podacima koji prikazuju udio proteina tijekom 10 dana biološke obrade koje je posljedica djelovanja enzima uključenih u razgradnju proteina u svrhu opskrbe mikroorganizma dušikom potrebnim za rast i provedbu daljnjih metaboličkih procesa. Porast udjela proteina nakon 15. dana SSF-a u biorektoru s pliticama u odnosu na

10. dan uzrokovan je razvojem micelija, koje prati porast koncentracije ergosterola u biomasi, o čemu govore rezultati prikazani u potpoglavlju 4.4.3. (**Slika 4.27.**).

Tijekom svih 15 dana SSF-a tropa grožđa (F 2017.) s *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama, uočeno je povećanje udjela masti za 44 %. U procesu provedenom u bioreaktoru s pliticama udio masti je nakon 5. dana fermentacije porastao za 48 %, nakon čega se smanjivao do kraja fermentacije. Akumulacija lipida u hranjivoj podlozi potaknuta je ograničenim nutritivnim uvjetima, kao što je ograničenje dušika i višak izvora ugljika. U ranoj fazi fermentacije, u kojoj su dostupne sve potrebne hranjive tvari u visokim koncentracijama, dominira proizvodnja biomase s manjim udjelom lipida i potrošnja izvora C i N. Međutim, nakon značajnog smanjenja udjela dušika u mediju za fermentaciju, pojedini mikroorganizmi počinju akumulirati lipide (Dulf et al., 2020; Suleiman et al., 2018), što je slučaj u ovom procesu biološke obrade tropa grožđa pomoću *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama. Ukoliko se udio lipida počne smanjivati kao što je bio slučaj tijekom SSF-a u bioreaktoru s pliticama nakon 10. i 15. dana, to ukazuje na to da ih mikroorganizam metabolizira u svrhu opskrbe energijom za svoj rast (Kupski et al., 2012).

#### 4.4.2. Analiza minerala i nepoželjnih tvari u tropu grožđa

Kako bi se ispitala potencijalna primjena tropa grožđa u proizvodnji hrane za životinje u uzorcima tropa grožđa prije i nakon biološke obrade analizirani su minerali i teški metali, octena i mliječna kiselina, poliaromatski ugljikovodici (PAH) i poliklorirani bifenili (PCB) te mikotoksini, a rezultati analiza prikazani su u **Tablici 6 i 7.**

**Tablica 6.** Udio elemenata u tropu grožđa (F 2017.) prije („0.“ dan) i nakon SSF (15. dan) pomoću *R. oryzae* u bioreaktoru s pliticama

Element	Metoda određivanja	Tehnika određivanja	Mjerna jedinica	Određena vrijednost	
				„0.“ dan	15. dan
Fosfor (P)	HRN ISO 6491:2001 *	spektrofotometrijski	%	0,30	0,28
Kalcij (Ca)	RU-305-05 **	ICP-MS	mg/kg	4967	5030
Kalij (K)	RU-305-05	ICP-MS	mg/kg	22130	11219
Željezo (Fe)	RU-305-05	ICP-MS	mg/kg	103	87
Olovo (Pb)	RU-305-05 **	ICP-MS	mg/kg	0,064	0,060
Kadmij (Cd)	RU-305-05 **	ICP-MS	mg/kg	0,025	0,027
Arsen (As)	RU-305-05 **	ICP-MS	mg/kg	0,024	0,018

\* akreditirana metoda prema HRN EN ISO/IEC 17025:2017 (analizirano u ovlaštenom laboratoriju)

\*\* akreditirana metoda u fleksibilnom području prema HRN EN ISO/IEC 17025:2017 (analizirano u ovlaštenom laboratoriju)

Priprema stočne hrane zahtijeva prisutnost određenih minerala potrebnih za zdravlje i produktivnost životinja, a brojni elementi u tragovima dodaju se stočnoj hrani kao aditivi. Neki elementi kao što su As, Cd, F, Pb i Hg, smatraju se nepoželjnim ukoliko prelaze propisane dopuštene koncentracije (Zeko-Pivač et al., 2022). Prema EU DIREKTIVI 2002/32/EC (2002) najveća dopuštena koncentracija arsena u hrani za životinje je 2 mg/kg, a za olovo 10 mg/kg, dok su dopuštene koncentracije kadmija u krmivima biljnog podrijetla i komplementarnoj hrani 1 i 0,5 mg/kg.

Ukupan udio PAH-ova, PCB-a i mikotoksina u početnom i biološki obrađenom uzorku tropa grožđa izražen je kao granica kvantifikacije (LOQ), a rezultati su prikazani u **Tablici 7**. PCB u stočnoj hrani su skupina složenih tvari koje mogu utjecati na hormonalni, živčani i imunološki sustav životinja, a PAH-ovi imaju kancerogena i mutagena svojstva te izazivaju poremećaje imunološkog sustava, mokraćnog sustava i oštećenje kože i pluća. Istraživanja su pokazala da su u krmnim smjesama za svinje i krave detektirani PAH-ovi u koncentracijama od 0,082 i 0,128 mg/kg (Şahin et al., 2022), dok su u studiji koju su objavili Zeko-Pivač i sur. (2022) bili < 0,020 mg/kg LOQ u neobrađenom i fermentiranom pivskom tropu. Prema EU DIREKTIVI 2002/32/EC (2002) najveća dopuštena koncentracija aflatoksina u stočnoj hrani iznosi 0,02 mg/kg.

U uzorcima tropa grožđa nakon SSF-a utvrđena je prisutnost octene kiseline, a udio nepoželjnih tvari poput poliaromatskih ugljikovodika (PAH), polikloriranih bifenila (PCB) i mikotoksina nije prelazio dozvoljene granične vrijednosti (**Tablica 7**).

**Tablica 7.** Analiza tropa grožđa (F 2017.) prije („0.“ dan) i nakon SSF (15. dan) pomoću *R. oryzae* u bioreaktoru s pliticama

Ispitivani parametar	Metoda određivanja	Tehnika određivanja	Mjerna jedinica	Određena vrijednost	
				„0.“ dan	15. dan
<b>Kiseline</b>					
Octena kiselina	RU-020-03	-	%	33,27	100
Mliječna kiselina	RU-020-03	-	%	66,73	0
<b>Štetne tvari i zagađivači</b>					
PAH	RU-256-02	GC-MS	mg/kg	< 0,020	< 0,020
PCB	RU-231-05	GC-MS	mg/kg	< 0,035	< 0,035
<b>Mikotoksini</b>					
Aflatoksini	RU-287-04 *	LC-MS	mg/kg	< 0,003	< 0,003
Fumonizini	RU-287-04 *	LC-MS	mg/kg	< 0,030	< 0,030
Zearalenon	RU-287-04 *	LC-MS	mg/kg	< 0,030	< 0,030
T-2 / HT-2 toksin	RU-287-04 *	LC-MS	mg/kg	< 20	< 20
Deoksinivalenool	RU-287-04 *	LC-MS	mg/kg	< 0,020	< 0,020
Oktratksin A	RU-287-04 *	LC-MS	mg/kg	< 0,001	< 0,001

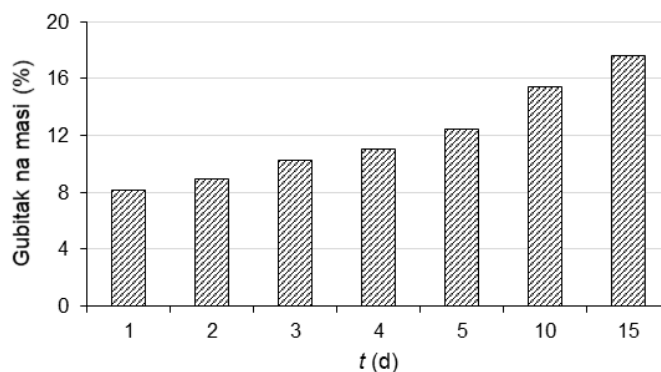
PAH - poliaromatski ugljikovodici (benz(a)antracen, benzo(a)piren, benzo(b)fluoranten i krizen); PCB - poliklorirani bifenili (poliklorirani bifenili 28, 52, 101, 118, 135, 153 i 180); aflatoksini (aflatoksin B1, B2, G1, G2); fumonizini (fumonizin B1 i B2)

\* akreditirana metoda u fleksibilnom području prema HRN EN ISO/IEC 17025:2017 (analizirano u ovlaštenom laboratoriju)

#### 4.4.3. Gubitak na masi supstrata

Brojni parametri kao što su veličina čestica supstrata, udio vlage, protok zraka, i temperatura utječu na rast mikroorganizma tijekom procesa SSF. Sastav hranjive podloge, odnosno supstrata koji se koristi u SSF vrlo je važan za rast mikroorganizma, ali i za proizvodnju sekundarnih metabolita. Tijekom SSF procesa mikroorganizmi koriste hranjive tvari iz supstrata za svoj rast i razvoj i proizvode kompleksni sustav enzima koji kataliziraju biotransformacijske procese te na taj način sudjeluju u razgradnji čvrstog matriksa supstrata. Kao posljedica toga dolazi do oslobađanja visokovrijednih komponenti vezanih za matriks, kao što su bioaktivne tvari, a ujedno i do gubitka na masi supstrata. Ove karakteristike čine SSF potencijalnom tehnologijom za proizvodnju visokovrijednih produkata, a u konačnici i za smanjenje količine nastalih proizvodnih ostataka (Larios-Cruz et al., 2019). SSF tropa grožđa (F 2017.) pomoću *R. oryzae* tijekom 15 dana u laboratorijskim staklenkama rezultirala je gubitkom mase supstrata od 17,58 %, uzimajući u obzir konačnu masu supstrata u odnosu na početnu masu supstrata (**Slika 4.26.**).





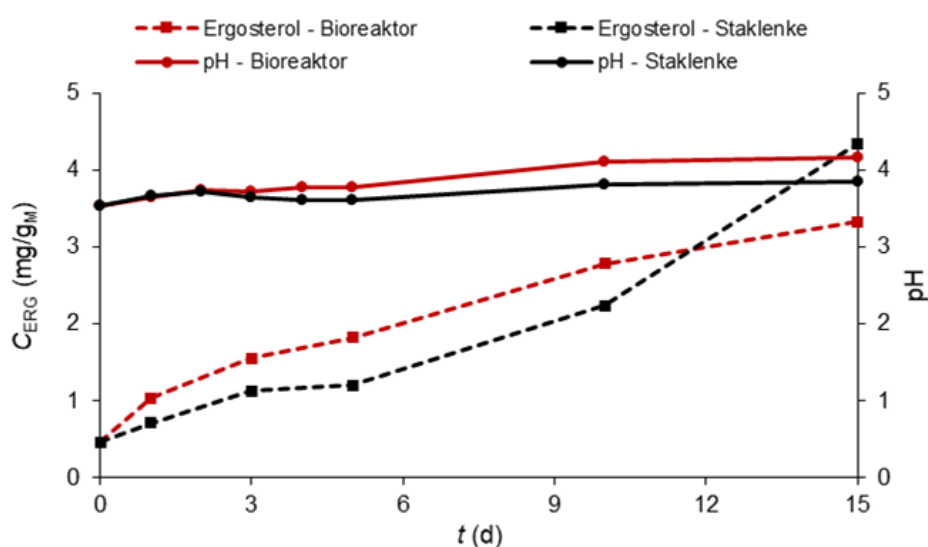
**Slika 4.26.** Gubitak na masi supstrata (trop grožđa sorte frankovka (F 2020.)) tijekom SSF-a (1. – 5., 10, 15. dan) pomoću *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama

#### 4.4.4. Koncentracija biomase

*R. oryzae* karakterizira brzi rast i mogućnost iskorištenja raznih spojeva i polisaharida kao izvora energije i ugljika. Zbog brzog rasta poznata je kao primarni ili sekundarni kolonizator, sa svojstvom brzog prodiranja kroz probavljive supstrate tj. supstrate bogate jednostavnim šećerima (Londoño-Hernández et al., 2017). Zbog nemogućnosti razdvajanja mikrobne biomase i supstrata u procesima SSF, gotovo je nemoguće odrediti točnu koncentraciju biomase te se za njezinu procjenu koriste različite indirektno metode kao što su određivanje udjela proteina, nukleinskih kiselina, glukozamina i ergosterola (Kumar et al., 2021). Određivanje udjela ergosterola, primarnog sterola prisutnog u staničnim membranama filamentoznih gljiva, korišteno je u ovom radu kao neizravna metoda za procjenu rasta primijenjenog mikroorganizma.

Najveći udio ergosterola izmjeren je nakon 15. dana SSF-a tropa grožđa pomoću *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama (4,34 mg/g<sub>M</sub>) i bioreктору s pliticama (3,32 mg/g<sub>M</sub>). Kao što je vidljivo na **Slici 4.27.**, udio ergosterola u tropu grožđa u oba procesa kontinuirano raste do 15. dana fermentacije. Prvih 5 dana fermentacije obilježava prilagodba (lag faza) budući da je mikroorganizmima potrebno određeno vrijeme da se prilagode novoj okolini, nakon čega slijedi eksponencijalni rast sve do 15. dana SSF-a (eksponencijalna faza) što ukazuje na fazu ubrzanog rasta. Uvjeti u kojima mikroorganizam raste (temperatura i dostupnost nutrijenata) uvelike utječu na brzinu rasta mikroorganizma. Nešto veći udio ergosterola uočen je već od samog početka fermentacije u procesu provedenom u bioreктору s pliticama iz razloga što je prilikom uvećanja mjerila procesa supstrat na plitici inokuliran s već uzgojenom kulturom u laboratorijskim staklenkama te je ostvarena brža prilagodba i rast *R. oryzae* u odnosu na laboratorijske staklenke gdje je inokulum bila pripremljena suspenzija spora te je kulturi trebalo više vremena da se prilagodi uvjetima i počne rasti.

Na **Slici 4.27.** je također vidljivo kako se nakon 10. dana fermentacije u staklenkama udio ergosterola naglo povećava u odnosu na njegov udio nakon 10. dana SSF u bioreaktoru. Razlog tome je povećana proizvodnja mikrobne biomase tijekom procesa fermentacije zbog bolje konzumacije lako dostupnih šećera, primjerice glukoze, čiji se udio 15. dan fermentacije u laboratorijskim staklenkama smanjio na  $0,78 \pm 0,69$  mg/g<sub>s.t.</sub> (za 63 % u odnosu na 10. dan SSF-a), a u bioreaktoru na  $2,14 \pm 0,22$  mg/g<sub>s.t.</sub> (za 19 % u odnosu na 10. dan SSF-a). Kada se pogledaju rezultati analize šećera tijekom SSF-a (**Tablica 5.**), vidljivo je da njihova razgradnja prati trend porasta koncentracije biomase odnosno povećanje udjela ergosterola.

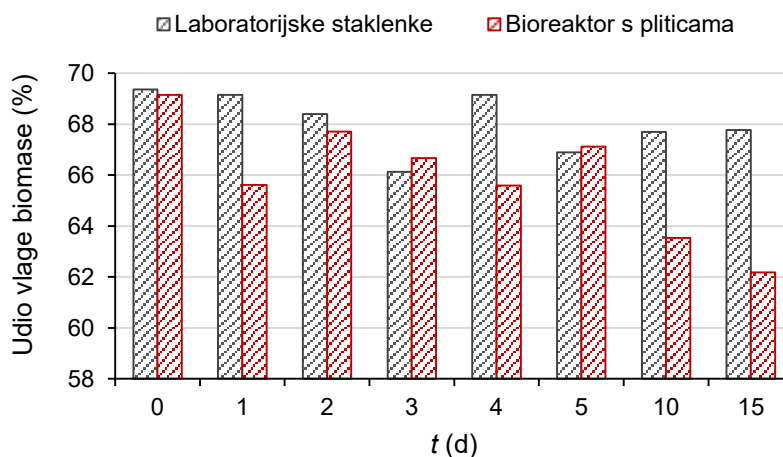


**Slika 4.27.** Koncentracija ergosterola i pH-vrijednost ekstrakata troja grožđa prije („0.“ dan) i tijekom 15 dana procesa SSF-a troja grožđa sorte frankovka (F 2017.) pomoću *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

**Slika 4.27.** također prikazuje pH-vrijednost ekstrakata troja grožđa prije („0.“ dan) i nakon SSF-a (1. – 5., 10. i 15. dana) s *R. oryzae* koja se u laboratorijskim staklenkama kretala u rasponu od 3,54 do 3,85, a u bioreaktoru s pliticama od 3,54 do 4,16. Na **Slici 4.27.** može se uočiti smanjenje pH-vrijednosti 3. dan fermentacije u odnosu na prva dva dana, vjerojatno zbog proizvodnje organskih kiselina, nakon čega pH ima ujednačenu vrijednost s blagim porastom do kraja fermentacije. Porast pH može biti posljedica asimilacije organskih kiselina od strane mikroorganizma (Botella et al., 2007), a također se može povezati s povećanjem aktivnosti enzima proteaze koji svojim djelovanjem dovodi do oslobađanja aminokiselina iz razgrađenih proteina (Lopes et al., 2016).

Prisutna voda također ima važnu ulogu u SSF-u za rast mikroorganizma, zbog njezine apsorpcije u supstratu te zbog potrošnje hranjivih tvari, pri čemu je voda ključna za njihovo otapanje i prijenos. Kao što je vidljivo na **Slici 4.28.**, udio vlage u biomasi se postepeno

smanjivao tijekom SSF-a u oba procesa. Razlog tome je isparavanje vode potaknuto stvaranjem metaboličke topline, koja je ujedno kompenzirala utrošak topline potrebne za isparavanje (latentna toplina isparavanja) te pri tome nije dolazilo do promjene temperature u sloju biomase (**Slika 4.25.**). Udio vlage u supstratu prije pokretanja SSF procesa („0.“ dan) u laboratorijskim staklenkama iznosio je 69,37 % te 15. dan fermentacije 67,77 % (smanjenje za 2,3 %), a u bioreaktoru 69,15 % („0.“ dan) i 62,18 % 15. dan SSF-a (smanjenje za 10,1%). Odvijanje SSF procesa u bioreaktoru uz prirodnu aeraciju (kako bi se izbjeglo širenje spora uslijed brzog rasta *R. oryzae*) i ovlaživanje materijala na pliticama pomoću vanjskog spremnika sa sterilnom vodom pokazalo se prikladnim za sprječavanje prekomjernog isušivanja biomase na pliticama i održavanje udjela vlage u rasponu optimalnom za rast mikroorganizma i uspješno provođenje SSF procesa.

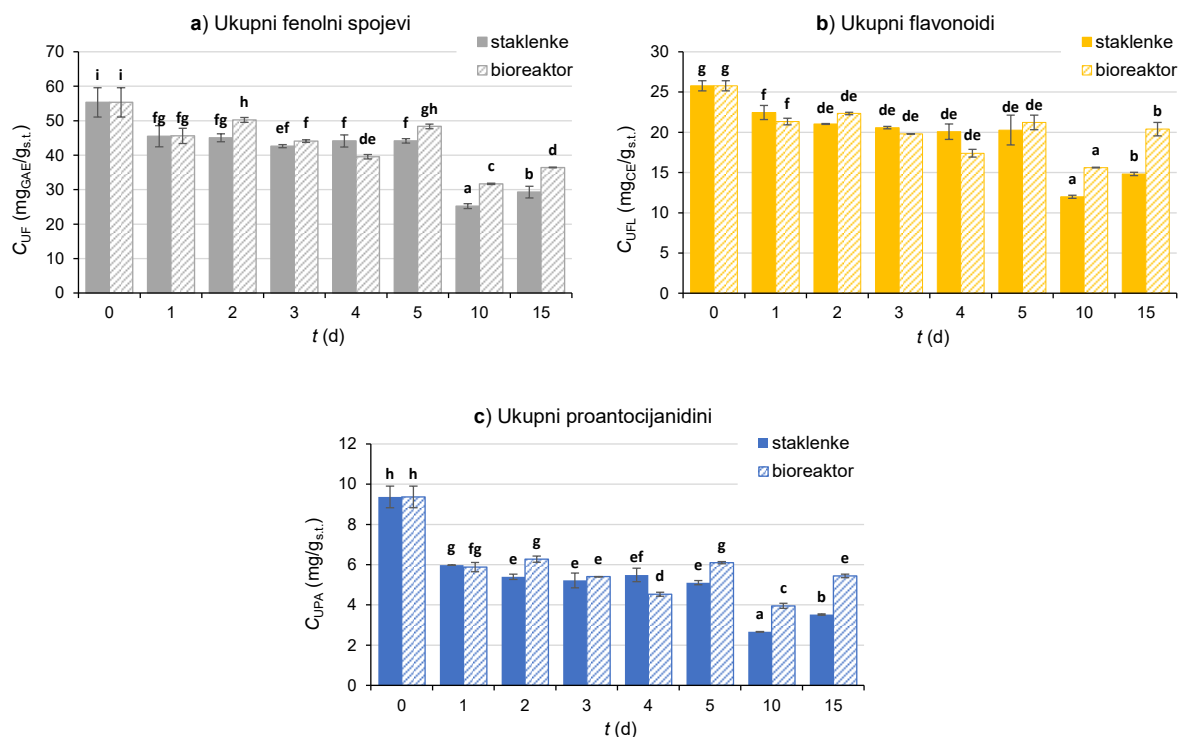


**Slika 4.28.** Udio vlage u biomasi tijekom (0. – 5., 10., 15. dan) SSF-a tropa grožđa (F 2017.) pomoću *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

#### 4.4.5. Utjecaj biološke obrade tropa grožđa pomoću *R. oryzae* na prinos ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida, ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina i antioksidacijsku aktivnost

U ekstraktu početnog biološki neobrađenog tropa grožđa („0.“ dan) i ekstraktima dobivenim nakon biološke obrade tropa grožđa pomoću *R. oryzae* (1. – 5. , 10., 15. dan) određen je udio ukupnih fenolnih spojeva (UF), ukupnih flavonoida (UFL) i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina (UPA) (**Slika 4.29.**) te je izmjerena antioksidacijska aktivnost DPPH, FRAP i ABTS metodama (**Slika 4.30.**). SSF nije utjecala na povećanje prinosa UF, UFL i UPA, čiji se

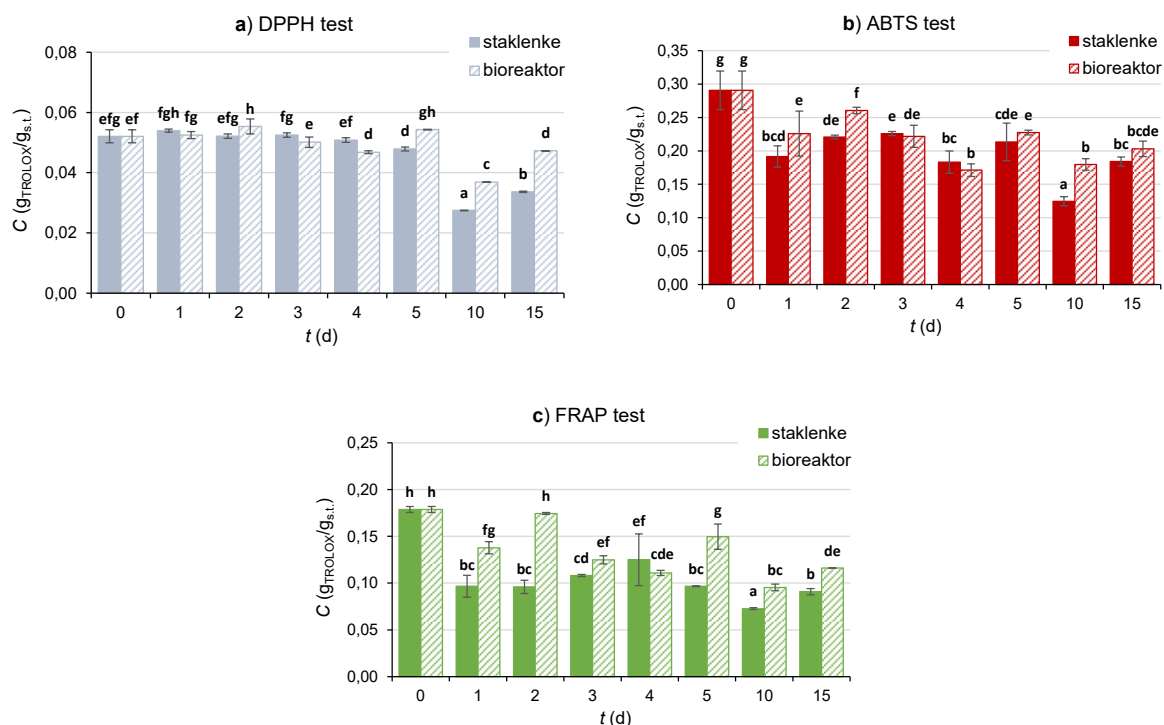
udio nakon 15. dana fermentacije u laboratorijskim staklenkama smanjio za 47 %, 43 % i 62 %, a u bioreaktoru s pliticama za 34 %, 21 % i 42 % (Slika 4.29.).



**Slika 4.29.** Maseni udio ukupnih fenolnih spojeva, UF (a), ukupnih flavonoida, UFL (b) i ukupnih ekstraktibilnih proantocijanidina, UPA (c) u ekstraktima dobivenim iz tropa grožđa sorte frankovka (F 2017.) prije „0.“ dan) i nakon SSF-a pomoću RO u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama (1. – 5., 10., 15. dan). Uzorci označeni različitim malim slovima abecede međusobno su statistički značajno različiti ( $p < 0,05$ , *post-hoc* Duncanov test višestrukih raspona).

Razlog smanjenja UF, UFL i UPA je enzimaska razgradnja i/ili polimerizacija fenolnih tvari oslobođenih uslijed rasta gljive (Zambrano et al., 2018). Autori Papadaki i sur. (2019) su u svojim istraživanjima također uočili smanjenje UF za 74 % nakon 20 dana SSF-a tropa grožđa pomoću *P. pulmonarius*, kao i Troncozo i sur. (2020) za 20,48 % nakon 90 dana SSF-a tropa grožđa s *Peniophora albobadia*. Das i sur. (2015) su koristili *R. oryzae* za biološku obradu jabučnog tropa u SSF uvjetima pri čemu je ostvaren porast udjela UF-a za 81,5 % nakon 14 dana fermentacije što je ukazivalo na učinkovitu biorazgradnju polisaharida (celuloze i hemiceluloze) i lignina pomoću *R. oryzae*. Razlika u dobivenim rezultatima u navedenom radu gdje je jabučni trop korišten kao supstrat i u ovom istraživanju gdje je korišten trop grožđa vjerojatno je ostvarena zbog različitog kemijskog sastava jednog i drugog supstrata što može znatno utjecati na rast mikroorganizma, a samim time i na razgradnju polisaharida i lignina te na udio fenolnih spojeva.

Sličan trend kao UF, UFL i UPA prati i antioksidacijska aktivnost ekstrakata tijekom biološke obrade tropa grožđa s *R. oryzae* (Slika 4.30.), čije smanjenje je posljedica razgradnje bioaktivnih tvari odgovornih za antioksidacijski potencijal (Teles et al., 2019).



**Slika 4.30.** Antioksidacijska aktivnost (DPPH metoda (a), ABTS metoda (b), FRAP metoda (c)) ekstrakata tropa grožđa sorte frankovka (F 2017.) prije („0.“ dan) i nakon SSF-a (1. – 5., 10., 15. dan) pomoću RO u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama. Uzorci označeni različitim malim slovima abecede međusobno su statistički značajno različiti ( $p < 0,05$ , *post-hoc* Duncanov test višestrukih raspona).

Kako bi se točnije odredila antioksidacijska aktivnost dobivenih ekstrakata, u ovom radu su korištene tri metode (DPPH, ABTS i FRAP) koje se temelje na različitim reakcijskim mehanizmima. Biološka obrada tropa grožđa pomoću *R. oryzae* utjecala je na smanjenje antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH, ABTS i FRAP metodama za 35 %, 37 % i 49 % u laboratorijskim staklenkama te za 10 %, 30 % i 35 % u bioreaktoru s pliticama, nakon 15. dana SSF-a. Leite i sur. (2019) ispitivali su utjecaj primjene različitih mikroorganizama i supstrata u SSF-u na prinos UF i antioksidacijsku aktivnost, pri čemu je uzgoj *R. oryzae* na tropu grožđa (mješavina tropa bijelog i crnog grožđa) rezultirao povećanjem prinosa UF i antioksidacijske aktivnosti, dok je primjena sjemenki grožđa kao supstrata imala suprotan učinak te rezultirala njihovim smanjenjem nakon 7 dana fermentacije.

#### 4.4.6. Utjecaj biološke obrade pomoću *R. oryzae* na prinos pojedinačnih fenolnih tvari iz tropa grožđa

Za razliku od rezultata koji pokazuju utjecaj SSF-a na ekstraktibilnost ukupnih fenolnih tvari (UF, UFL, UPA), analiza pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima je pokazala pozitivan utjecaj SSF-a na njihovu ekstraktibilnost. Od kvantificiranog 21 fenolnog spoja u ekstraktima tropa grožđa (F 2017.), SSF s *R. oryzae* je imala pozitivan utjecaj na ekstraktibilnost 11 pojedinačnih fenolnih spojeva, čiji su udjeli prije („0.“ dan,  $C_0$ ) i nakon SSF-a ( $C_{i,max}$  – maksimalni udio pojedinačnog fenolnog spoja u ekstraktu) prikazani u **Tablici 8**. U slučaju ferulinske kiseline, o-kumarinske kiseline, katehina, epikatehina, galokatehin galata, rutina, kaempferola, procijanidina B1, procijanidina B2 i  $\epsilon$ -viniferina nije uočeno povećanje prinosa nakon SSF, stoga ti rezultati nisu prikazani u nastavku.

Maseni udjeli fenolnih spojeva prikazani u **Tablici 8**. pokazuju da se ukupni prinos određenih ispitivanih pojedinačnih fenolnih tvari u ekstraktima tropa grožđa (F 2017.) povećao nakon SSF, odnosno upućuju na opravdanost primjene biološke obrade tropa grožđa u cilju povećanja koncentracije ekstrahiranih pojedinačnih fenolnih tvari.

Razlika u rezultatima učinka SSF-a na (ne)povećanje koncentracije fenolnih tvari u ekstraktima kada se promatraju ukupno ekstrahirane fenolne tvari i pojedinačni fenolni spojevi leži u činjenici da Folin-Ciocalteuov reagens koji se koristi za određivanje ukupnih fenolnih spojeva reagira ne samo s fenolnim spojevima, nego i s aminokiselinama, šećerima i drugim reducirajućim tvarima prisutnim u ekstraktima, koji su u većim koncentracijama bili prisutni u ekstraktima tropa grožđa prije SSF-a nego nakon provedbe SSF-a. Navedeno može uzrokovati razlike između sadržaja fenolnih tvari u ekstraktima, koji je određen spektrofotometrijskim, odnosno kromatografskim metodama. Ovo zapažanje zabilježili su i Zambrano i sur. (2018) u svom istraživanju u kojem su ispitali utjecaj SSF-a i direktnog enzimskog tretmana (koristeći celulolitički koktel) na ekstraktibilnost ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva iz tropa grožđa, jabučnog tropa i ostataka pitaye.

**Tablica 8.** Udio pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa sorte frankovka (F 2017.) dobivenim prije SSF-a („0.“ dan,  $C_0$ ) i nakon SSF-a pomoću *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama (maksimalni udio pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima tropa grožđa zabilježen nakon određenog trajanja SSF-a,  $C_{i,max}$ )

Pojedinačni polifenolni spojevi	„0.“ dan		SSF u laboratorijskim staklenkama		SSF u bioreaktoru s pliticama		
	$C_0$ ( $\mu\text{g/g}_{s.t.}$ )*	$C_{i,max}$ ( $\mu\text{g/g}_{s.t.}$ )*	$p^{**}$	$t_{SSF}$ (d)	$C_{i,max}$ ( $\mu\text{g/g}_{s.t.}$ )*	$p^{**}$	$t_{SSF}$ (d)
<b>Fenolne kiseline (hidroksibenzojeve kiseline)</b>							
Galna kiselina	307,20 ± 3,10	447,88 ± 33,15	0,0149	4.	490,77 ± 15,31	0,0033	4.
Elaginska kiselina	208,44 ± 4,42	235,50 ± 6,27	0,0483	3.	233,49 ± 1,62	0,0188	10.
p-Hidroksibenzojeva kiselina	6,07 ± 0,44	14,30 ± 0,79	0,0006	4.	11,79 ± 0,17	0,0008	3.
Siringinska kiselina	236,63 ± 1,28	424,04 ± 4,96	0,0004	5.	282,00 ± 18,34	0,0441	1.
Vanilinska kiselina	80,81 ± 1,31	97,49 ± 0,79	0,0053	2.	93,68 ± 6,57	0,0514	1.
3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina	111,51 ± 2,17	234,14 ± 9,27	0,0029	10.	194,24 ± 3,78	0,0017	4.
<b>Fenolna kiselina (hidroksicimetna kiselina)</b>							
p-Kumarinska kiselina	8,76 ± 0,70	9,65 ± 0,55	0,0098	4.	10,23 ± 0,17	0,1000	4.
Kafeinska kiselina	13,12 ± 0,46	15,07 ± 0,17	0,0070	1.	17,14 ± 0,99	0,0058	1.
<b>Flavan-3-ol</b>							
Epikatehin galat	319,26 ± 3,39	366,73 ± 5,08	0,0004	1.	453,49 ± 15,62	0,0028	1.
<b>Flavonol</b>							
Kvercetin	403,10 ± 9,04	657,79 ± 13,33	0,0001	15.	714,91 ± 15,92	0,0021	10.
<b>Stilben</b>							
Resveratrol	30,40 ± 0,69	30,63 ± 0,37	0,7370	3.	76,19 ± 0,41	0,0000	15.

\* Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ( $n = 3$ ) ± SD.

\*\* Za usporedbu srednjih vrijednosti koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva između „0.“ dana (biološki neobrađen uzorak tropa grožđa) i dana fermentacije kada je postignut maksimalni prinos pojedinačnih fenolnih spojeva korišten je Studentov t-test za zavisne uzorke uz stupanj sigurnosti 95 % (crveno obojene vrijednosti - statistički značajna razlika uz  $p < 0,05$ ).

Statistički značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje ekstraktibilnosti pojedinačnih fenolnih tvari iz tropa grožđa nakon biološke obrade u laboratorijskim staklenkama uočeno je za sve spojeve navedene u **Tablici 8.**, osim za resveratrol, a nakon biološke obrade u bioreaktoru s pliticama statistički značajno ( $p < 0,05$ ) povećanje ekstraktibilnosti uočeno je za sve spojeve navedene u tablici osim za vanilinsku kiselinu i *p*-kumarinsku kiselinu.

Od hidroksibenzojevih kiselina statistički značajan porast prinosa nakon biološke obrade tropa grožđa pomoću *R. oryzae* uočen je kod galne kiseline čiji je maksimalni udio iznosio  $307,20 \pm 3,10 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$  nakon četvrtog dana fermentacije u laboratorijskim staklenkama (povećanje od 1,5 puta u odnosu na udio u početnom biološki neobrađenom uzorku), te  $447,88 \pm 33,15 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$  (povećanje od 1,6 puta) u bioreaktoru s pliticama. Porast prinosa elaginske kiseline za 1,1 puta postignut je SSF u laboratorijskim staklenkama kada se njen udio povećao s  $208,44 \pm 4,42 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$  („0.“ dan) na  $235,50 \pm 6,27 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$  (3. dan), a u bioreaktoru s pliticama na  $233,49 \pm 1,62 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$  (10. dan). Također, povećanje prinosa *p*-hidroksibenzojeve kiseline za 2,4 puta uočeno je nakon fermentacije u laboratorijskim staklenkama (4. dan) te za 1,9 puta nakon fermentacije u bioreaktoru s pliticama (3. dan). SSF pomoću *R. oryzae* utjecala je i na povećanje ekstraktibilnosti siringinske kiseline u laboratorijskim staklenkama te u bioreaktoru s pliticama gdje je njezin prinos porastao za 1,8 puta (5. dan) i za 1,2 puta (1. dan). Što se tiče vanilinske kiseline, statistički značajan porast prinosa za 1,2 puta je uočen nakon drugog dana SSF u laboratorijskim staklenkama, dok u bioreaktoru s pliticama nije došlo do statistički značajnog povećanja prinosa. Zatim, povećanje prinosa zabilježeno je kod 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline za 2,1 puta (10. dan) u laboratorijskim staklenkama te za 1,7 puta (4. dan) u bioreaktoru s pliticama, u odnosu na početni biološki neobrađeni uzorak.

Od hidroksicimetnih kiselina statistički značajan porast prinosa je uočen kod kafeinske kiseline u oba procesa te kod *p*-kumarinske kiseline u procesu provedenom u laboratorijskim staklenkama gdje je uočeno povećanje od 1,1 puta (4. dan). SSF s *R. oryzae* u bioreaktoru s pliticama nije utjecala na statistički značajno povećanje *p*-kumarinske kiseline.

SSF pomoću *R. oryzae* utjecala je i na porast udjela flavan-3-ola (epikatehin galata), pri čemu se njegov udio povećao za 1,1 nakon SSF u staklenkama i za 1,4 nakon SSF u bioreaktoru, nakon prvog dana fermentacije u oba slučaja.

Od flavonola, uočeno je povećanje prinosa kvercetina za 1,6 puta nakon 15. dana fermentacije u laboratorijskim staklenkama gdje se njegov udio povećao s  $403,10 \pm 9,04 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$  („0.“ dan) na  $657,79 \pm 13,33 \mu\text{g/g}_{\text{s.t.}}$ . U procesu provedenom u bioreaktoru, maksimalno povećanje prinosa za 1,8 puta uočeno je nakon 10. dana fermentacije u odnosu na njegov udio u početnom biološki neobrađenom uzorku.



Što se tiče stilbena, statistički značajno povećanje prinosa resveratrola nakon SSF-a u staklenkama nije ostvareno, ali je nakon 15. dana SSF-a u bioreaktoru s pliticama njegov maksimalni prinos porastao za 2,5 puta. Amaya-Chantaca i sur. (2021) su na temelju rezultata dobivenih nakon SSF-a tropa grožđa s *A. niger* utvrdili da je najviše fenolnih spojeva detektirano između 12 i 36 sati fermentacije pri čemu su najzastupljeniji bili kafeinska kiselina-4-O-glukozid, galna kiselina-4-O-glukozid, derivati elaginske kiseline, katehini, flavonoli poput kaempferola i dr.

Kao što se može vidjeti iz rezultata u **Tablici 8.**, uvećanje mjerila procesa u bioreaktoru s pliticama pokazalo se učinkovitijim za povećanje ekstrakcijskog prinosa spojeva galne kiseline, kafeinske kiseline, epikatehin galata, kvercetina i resveratrola, dok su preostali spojevi (elaginska kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, siringinska kiselina, vanilinska kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina i *p*-kumarinska kiselina) veći prinos imali u procesu provedenom u laboratorijskim staklenkama.

#### 4.4.7. Korelacija između hidrolitičkih i lignolitičkih enzima i pojedinačnih fenolnih tvari iz tropa grožđa

Tijekom procesa SSF mjerena je aktivnost hidrolitičkih ( $\beta$ -glukozidaze, ksilanaze, celulaze, invertaze) i lignolitičkih enzima (lakaze, mangan peroksidaze (MnP), lignin peroksidaze (LiP)) radi boljeg razumijevanja njihovog djelovanja u kataliziranju biotransformacijskih procesa tijekom biološke obrade tropa grožđa te njihove uloge u povećanju ekstrakcijskog prinosa fenolnih spojeva. Analizom ekstrakata dobivenih nakon biološke obrade tropa grožđa pomoću *R. oryzae* utvrđena je prisutnost svih navedenih enzima, a rezultati su prikazani u **Tablici 9.** Kao što se može vidjeti u **Tablici 9.**, tijekom SSF-a s *R. oryzae* uočena je niska aktivnost lignolitičkih enzima (lakaza, MnP, LiP), pri čemu aktivnost MnP tijekom 1. i 15. dana SSF-a u laboratorijskim staklenkama te 1. i 5. dana u bioreaktoru s pliticama nije detektirana. Također se može vidjeti da s vremenom fermentacije aktivnosti lignolitičkih enzima rastu te je za pretpostaviti da bi se za postizanje značajnijih aktivnosti lignolitičkih enzima, a samim time i za bolju razgradnju lignina te za oslobađanje fenolnih spojeva iz strukture lignina, trebalo produžiti trajanje SSF-a. Od analiziranih hidrolitičkih enzima, najznačajnija aktivnost uočena je kod ksilanaze. Važno je napomenuti da učinkovita proizvodnja enzima tijekom SSF-a ovisi o nekoliko čimbenika kao što su specifičnost odabranog soja mikroorganizma, trajanje razdoblja inkubacije i uvjeti inkubacije. Važan parametar koji utječe na proces SSF i na samu proizvodnju enzima je omjer C/N, koji se najčešće u procesima SSF kreće u rasponu 15 – 35 (Ferreira et al., 2013; Filipe et al., 2020; Melanouri et al., 2022). U ovom istraživanju omjer TOC<sub>E</sub> : TN je dosta visok i raste tijekom SSF-a te se kretao u rasponu 1 : 55 – 1 : 74 od 1. do 15. dana fermentacije (uz napomenu da se radi o omjeru C/N koji je određen u ekstraktima tropa

grožđa). Kako bi se regulirao omjer C/N i općenito hranjive tvari u supstratu, trop grožđa je poželjno miješati s nekim drugim lignoceluloznim materijalom u SSF procesu. Primjerice, autori Teles i sur. (2019) koristili su mješavinu pšeničnih mekinja i tropa grožđa za uzgoj *A. niger* u svrhu proizvodnje hidrolitičkih enzima i povećanja prinosa bioaktivnih tvari, dok su Filipe i sur. (2020) kao supstrat za uzgoj *A. niger* i *A. ibericus* koristili mješavinu komine maslina i otpada iz vinarije s ciljem poboljšanja proizvodnje celulaze i ksilanaze te ekstraktibilnosti fenolnih tvari. Primjena mješavine tropa grožđa i kore naranče u omjeru 1 : 1 (w/w) pokazala se učinkovitom za proizvodnju hidrolitičkih enzima u bioreaktoru s pliticama u istraživanju koje su proveli Díaz i sur. (2013). Cilj ovog istraživanja nije bio proizvodnja hidrolitičkih i lignolitičkih enzima, nego su njihove aktivnosti izmjerene kako bi se utvrdila korelacija s fenolnim tvarima.

**Tablica 9.** Enzimska aktivnost hidrolitičkih i lignolitičkih enzima tijekom (1., 5., 10. i 15. dan) SSF-a tropa grožđa (F 2017.) pomoću *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

t <sub>SSF</sub> (d)	Hidrolitički enzimi				Lignolitički enzimi*		
	$\beta$ -glukozidaza (U/g <sub>s.t.</sub> )	Ksijanaza (U/g <sub>s.t.</sub> )	Celulaza (U/g <sub>s.t.</sub> )	Invertaza (U/g <sub>s.t.</sub> )	Lakaza (U/g <sub>s.t.</sub> )	MnP (U/g <sub>s.t.</sub> )	LiP (U/g <sub>s.t.</sub> )
<b>Laboratorijske staklenke</b>							
1.	0,421	25,517	0,234	n.d.	0,005	n.d.	0,013
5.	0,208	62,964	0,675	n.d.	0,001	0,001	0,006
10.	0,315	40,054	n.d.	8,198	0,001	0,005	0,039
15.	0,347	33,181	1,020	6,316	0,002	n.d.	0,040
<b>Bioreaktor s pliticama</b>							
1.	0,290	9,271	0,293	6,135	0,005	n.d.	0,036
5.	0,533	17,684	0,685	2,700	0,009	n.d.	0,026
10.	0,440	46,133	0,666	10,706	0,071	0,018	0,069
15.	0,430	47,673	0,523	7,344	0,072	0,018	0,074

\*mangan peroksidaza (MnP), lignin peroksidaza (LiP)

n.d. - nije detektirana aktivnost enzima

U ovom radu procijenjena je korelacija navedenih enzima s udjelom fenolnih tvari prije („0.“ dan) i nakon SSF-a (1., 5., 10. i 15. dan) tropa grožđa pomoću *R. oryzae*. Kako bi se procijenila korelacija aktivnosti enzima i pojedinih skupina fenolnih spojeva koje uključuju hidroksibenzojeve kiseline (galna, elaginska, *p*-hidroksibenzojeva, siringinska, vanilinska, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina), hidroksicimetne kiseline (*o*-kumarinska, *p*-kumarinska, ferulinska kiselina), flavan-3-ole (epikatehin galat, galokatehin galat), flavonole (kvercetin, kaempferol, rutin), procijanidine (procijanidin B1) i stilbene (resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin), radi jasnijeg prikaza rezultata, izračunat je zbroj pojedinačnih fenolnih spojeva iz svake skupine te suma svih identificiranih fenolnih tvari (UFT). Korelacijski koeficijent (*r*) prikazuje linearnu

povezanost između podataka, a njegova vrijednost može se kretati u rasponu od  $-1$  (idealna negativna linearna povezanost) do  $+1$  (idealna pozitivna linearna povezanost). Vrijednost koeficijenta korelacije  $0$  ukazuje na nepostojanje povezanosti podataka, a ukoliko je njegova vrijednost iznad  $+0,7$ , odnosno ispod  $-0,7$ , to ukazuje na snažnu pozitivnu, odnosno negativnu, linearnu povezanost podataka. Ostale vrijednosti ukazuju na srednju ili slabu povezanost podataka (Ratner, 2009). U **Tablici 10.** prikazan je koeficijent korelacije ( $r$ ) između koncentracije ukupnih hidroksibenzojevih kiselina (HBK), hidroksicimetnih kiselina (HCK), flavan-3-ola (F3L), flavonola (FL), procijanidina (PCD), stilbena (ST) i ukupnih fenolnih tvari (UFT) te aktivnosti hidrolitičkih ( $\beta$ -glukozidaze, ksilanaze, celulaze i invertaze) i lignolitičkih (lakaze, MnP i LiP) enzima u uzorcima tropa grožđa nakon SSF-a s *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama.

**Tablica 10.** Koeficijent korelacije ( $r$ ) između koncentracije pojedinih skupina polifenolnih spojeva i aktivnosti hidrolitičkih, odnosno lignolitičkih enzima u uzorcima tropa grožđa (F 2017.) nakon SSF s *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama

Skupine polifenolnih spojeva*	Hidrolitički enzimi				Lignolitički enzimi**		
	$\beta$ -glukozidaza	Ksilanaza	Celulaza	Invertaza	Lakaza	MnP	LiP
<b>HBK</b>	-0,433	0,555	-0,565	-0,552	-0,233	0,188	-0,739
<b>HCK</b>	0,149	0,014	-0,579	-0,755	0,404	-0,181	-0,790
<b>F3L</b>	0,116	0,051	-0,095	-0,970	0,474	-0,643	-0,919
<b>FL</b>	0,192	-0,323	0,717	0,533	0,014	-0,205	0,687
<b>PCD</b>	-0,476	0,618	-0,225	-0,810	-0,163	-0,201	-0,937
<b>ST</b>	-0,105	0,273	-0,274	-0,923	0,236	-0,398	-0,962
<b>UFT</b>	-0,331	0,487	-0,154	-0,913	0,019	-0,379	-0,987

\*ukupne hidroksibenzojeve kiseline (HBK), ukupne hidroksicimetne kiseline (HCK), ukupni flavan-3-oli (F3L), ukupni flavonoli (FL), ukupni procijanidini (PCD), ukupni stilbeni (ST), ukupne fenolne tvari (UFT)

\*\*mangan peroksidaza (MnP), lignin peroksidaza (LiP)

U **Tablici 10.** je vidljiva slaba pozitivna linearna povezanost između  $\beta$ -glukozidaze i HCK, F3L i FL, dok sa ostalim fenolnim skupinama ovaj enzima ima srednju ili slabu negativnu linearnu povezanost. Između ksilanaze i HBK, PCD i ST uočena je srednja i slaba pozitivna linearna povezanost, dok je povezanost ksilanaze i FL slaba negativna, dok povezanosti između ksilanaze i HCK i F3L gotovo da i nema budući da je  $r$  približan  $0$  ( $r = 0,014$  i  $r = 0,051$ ). Između celulaze i FL vidljiva je snažna pozitivna linearna povezanost budući da je  $r > 0,7$ , dok povezanosti između celulaze i F3L gotovo da i nema budući da je  $r$  približan  $0$  ( $r = -0,095$ ). Povezanost između celulaze i ostalih fenolnih spojeva (HBK, HCK, PCD, ST) je srednja negativna. Invertaza i HBK imaju srednju negativnu linearnu povezanost, a invertaza i FL srednju pozitivnu, dok s ostalim skupinama fenolnih spojeva invertaza ima snažnu negativnu

linearnu povezanost budući da je  $r > -0,7$ . Enzimaska aktivnost lakaze i HBK i PCD imaju slabu negativnu linearnu povezanost, dok je povezanost između lakaze i HCK, F3L i ST srednja i slaba pozitivna. Kod enzima MnP prevladava srednja i slaba negativna linearna povezanost s fenolnim skupinama, osim s HBK gdje je vidljiva slaba pozitivna linearna povezanost. Između enzima LiP i svih fenolnih skupina vidljiva je snažna negativna linearna povezanost budući da je  $r > -0,7$ , osim između LiP i FL gdje se radi o srednjoj pozitivnoj linearnoj povezanosti. S obzirom na gore navedeno, najveći utjecaj na udio fenolnih skupina u uzorcima tropa grožđa nakon SSF s *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama imala je aktivnost enzima invertaze i LiP, čije povećanje uzrokuje smanjenje udjela pojedinih fenolnih skupina. Izuzetak su flavonoli, čiji se udio povećava s porastom aktivnosti navedenih enzima. Kada se gleda korelacija između aktivnosti enzima i sume svih identificiranih fenolnih tvari, između aktivnosti invertaze i LiP i UFT vidljiva je snažna negativna linearna povezanost, dok  $\beta$ -glukozidaza, celulaza i MnP imaju srednju i slabu negativnu povezanost s UFT. Između aktivnosti ksilanaze i UFT uočena je srednja pozitivna linearna povezanost, a povezanosti između lakaze i UFT gotovo da i nema ( $r = 0,019$ ).

U **Tablici 11.** prikazan je koeficijent korelacije ( $r$ ) između koncentracije ukupnih hidroksibenzojevih kiselina (HBK), hidroksicimetnih kiselina (HCK), flavan-3-ola (F3L), flavonola (FL), procijanidina (PCD), stilbena (ST) i ukupnih fenolnih tvari (UFT) te aktivnosti hidrolitičkih ( $\beta$ -glukozidaze, ksilanaze, celulaze i invertaze) i lignolitičkih (lakaze, MnP i LiP) enzima u uzorcima tropa grožđa nakon SSF-a s *R. oryzae* u bioreaktoru s pliticama.

**Tablica 11.** Koeficijent korelacije ( $r$ ) između koncentracije pojedinih skupina polifenolnih spojeva i aktivnosti hidrolitičkih, odnosno lignolitičkih enzima u uzorcima tropa grožđa (F 2017.) nakon SSF s *R. oryzae* u bioreaktoru s pliticama

Skupine polifenolnih spojeva*	Hidrolitički enzimi				Lignolitički enzimi**		
	$\beta$ -glukozidaza	Ksilanaza	Celulaza	Invertaza	Lakaza	MnP	LiP
HBK	-0,494	-0,854	-0,472	-0,257	-0,801	-0,790	-0,735
HCK	-0,349	-0,966	-0,431	-0,534	-0,943	-0,937	-0,897
F3L	-0,235	-0,994	-0,387	-0,700	-0,992	-0,989	-0,961
FL	0,162	0,240	0,477	0,570	0,253	0,238	0,161
PCD	0,638	-0,532	0,472	-0,781	-0,635	-0,669	-0,790
ST	0,203	0,917	0,253	0,508	0,908	0,910	0,903
UFT	0,217	-0,792	0,133	-0,643	-0,838	-0,857	-0,922

\*ukupne hidroksibenzojeve kiseline (HBK), ukupne hidroksicimetne kiseline (HCK), ukupni flavan-3-oli (F3L), ukupni flavonoli (FL), ukupni procijanidini (PCD), ukupni stilbeni (ST), ukupne fenolne tvari (UFT)

\*\*mangan peroksidaza (MnP), lignin peroksidaza (LiP)

Iz rezultata u **Tablici 11.** vidljiva je srednja negativna linearna povezanost enzimske aktivnosti celulaze s HBK, HCK i F3L, dok koeficijent korelacije ukazuje na slabu i srednju pozitivnu linearnu povezanost između aktivnosti celulaze i FL, PCD i ST. Podaci ukazuju na slabu i srednju negativnu povezanost između aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze i HBK, HCK i F3L te na slabu i srednju pozitivnu povezanost između aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze i FL, PCD i ST. Između lignolitičkih enzima i fenolnih kiselina (HBK, HCK) te F3L vidljiva je snažna negativna linearna povezanost budući da je koeficijent korelacije  $> -0,7$ , a između lignolitičkih enzima i ST je snažna pozitivna linearna povezanost budući da je  $r$  u svim slučajevima veći od  $0,8$ . To isto vrijedi i za enzim ksilanazu. Povezanost između ksilanaze i lignolitičkih enzima s PCD je srednja i snažna negativna. Svi navedeni enzimi imaju slabu pozitivnu povezanost s FL, osim invertaze gdje je uočena srednja pozitivna linearna povezanost. Enzimska aktivnost invertaze ima srednju pozitivnu povezanost s FL i ST, a s F3L i PCD snažnu negativnu linearnu povezanost ( $r > -0,7$ ), dok s HBK i HCK ima srednju negativnu linearnu povezanost. Ukupno gledajući, povećanje aktivnosti enzima ksilanaze, lakaze, MnP i LiP rezultiralo je manjim udjelima HBK, HCK i F3L, odnosno većim udjelom ST, budući da u tim slučajevima  $r$  upućuje na snažnu linearnu povezanost. Između lignolitičkih enzima te ksilanaze i UFT vidljiva je snažna negativna linearna povezanost budući da je  $r > -0,7$ , dok je između invertaze i UFT uočena srednja negativna linearna povezanost. Koeficijent korelacije ukazuje na slabu pozitivnu linearnu povezanost između aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze i celulaze i UFT. Autori Teles i sur. (2019) su mjerili aktivnosti ksilanaze, karboksimetilcelulaze, poligalakturonaze,  $\beta$ -glukozidaze i tanaze tijekom SSF-a tropa grožđa i pšeničnih mekinja pomoću *A. niger* i pokazali da aktivnost enzima nije nužno proporcionalna otpuštanju bioaktivnih spojeva iz tropa grožđa.

## **5. ZAKLJUČCI**

- 1) Nakon provedbe dva načina ekstrakcije (konvencionalna ekstrakcija otapalom u vodenoj kupelji i ekstrakcija otapalom potpomognuta ultrazvukom) fenolnih spojeva iz tropa grožđa doneseni su sljedeći zaključci:
  - Veći prinosi fenolnih spojeva ostvareni su uz primjenu konvencionalne kruto-tekuće ekstrakcije u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju.
  - Kruto-tekuća ekstrakcija ultrazvukom utjecala je na ubrzavanje procesa ekstrakcije fenolnih tvari, a ostvareni prinos fenolnih tvari je bio manji u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju otapalom.
  - Na osnovu analize rezultata obje metode te činjenicom da su kromatogrami ekstrakata tropa grožđa dobiveni ultrazvučnom ekstrakcijom bili nejasniji za očitavanje u odnosu na kromatograme ekstrakata dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom, zaključeno je da je konvencionalna ekstrakcija otapalom prikladnija metoda za ekstrakciju fenolnih spojeva pod eksperimentalnim uvjetima ove disertacije te je dalje ista metoda korištena u eksperimentalnom radu.
  - Određeni su optimalni uvjeti konvencionalne ekstrakcije otapalom: ekstrakcija u vodenoj kupelji s tresilicom pri 200 rpm na temperaturi 80 °C pomoću 50 %-tne vodene otopine etanola u omjeru kruto-tekuće 40 mL/g tijekom 120 minuta.
- 2) Na temelju rezultata dobivenih *screeningom* profila fenolnih tvari ekstrakata tropa grožđa sorte cabernet sauvignon (2016.) dobivenih iz uzorka prije („0.“ dan) i nakon SSF-a (1.-5., 10. i 15. dan) pomoću 11 različitih filamentoznih gljiva u laboratorijskim staklenkama doneseni su sljedeći zaključci:
  - Najznačajnije povećanje ekstraktibilnosti nakon SSF-a u usporedbi s početnim biološki neobrađenim uzorkom uočeno je kod elaginske kiseline za 8,8 puta nakon 15. dana fermentacije pomoću *C. subvermispora*.
  - U pogledu povećanja ekstrakcijskog prinosa većine fenolnih tvari najučinkovitije od svih korištenih filamentoznih gljiva pokazale su se *P. eryngii* i *R. oryzae*.

SSF-om pomoću *P. eryngii* ostvaren je maksimalni ekstrakcijski prinos kod sedam fenolnih spojeva (od ukupno 18 kvantificiranih fenolnih spojeva kod kojih se povećala ekstraktibilnost nakon SSF-a): siringinske kiseline, galokatehin galata, kvercetina, rutina, kaempferola, procijanidina B2 i resveratrola, čiji se udio povećao za 2,4-, 3,7-, 3,8-, 1,2-, 4,4-, 1,1- i 1,5 puta u odnosu na udio u početnom biološki neobrađenom uzorku.

- SSF-om pomoću *R. oryzae* ostvaren je maksimalni ekstrakcijski prinos kod pet fenolnih spojeva (od ukupno 18 kvantificiranih fenolnih spojeva kod kojih se povećala ekstraktibilnost nakon SSF-a): galne kiseline, *p*-hidroksibenzojeve kiseline, vanilinske kiseline, *p*-kumarinske kiseline i procijanidina B1, čiji se udio povećao za 2,2-, 2,8-, 1,6-, 1,7- i 4,5 puta u odnosu na udio u početnom biološki neobrađenom uzorku.
- 3) Na temelju rezultata dobivenih *screeningom* profila fenolnih tvari ekstrakata tropa grožđa sorte frankovka 2017., merlot 2020. i cabernet sauvignon 2017. dobivenih iz uzorka prije („0.“ dan) i nakon SSF-a (1.-5. dana) pomoću *P. eryngii* i *R. oryzae* u laboratorijskim staklenkama doneseni su sljedeći zaključci:
- SSF s *R. oryzae* i *P. eryngii* utjecale su na povećanje ekstraktibilnosti ukupno 17 fenolnih spojeva od 21 kvantificiranog fenolnog spoja.
  - Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da su *R. oryzae* i trop grožđa sorte frankovka 2017. imali utjecaj na povećanje ekstraktibilnosti najvećeg broja fenolnih spojeva u eksperimentalnim uvjetima SSF-a pri čemu je maksimalni udio ostvaren kod 10 fenolnih spojeva (galna, elaginska, *p*-hidroksibenzojeva i siringinska kiselina, katehin, epikatehin, epikatehin galat, galokatehin galat, kvercetin i procijanidin B1 s povećanjem za 1,1 – 1,9 puta nakon SSF-a) te su stoga izabrani za daljnje eksperimente kojima je cilj uvećanje mjerila SSF-a u biorektoru s pliticama.
- 4) Na temelju ispitivanja utjecaja SSF-a pomoću *R. oryzae* na kemijski sastav tropa grožđa i udio fenolnih tvari u ekstraktima tropa grožđa doneseni su sljedeći zaključci:
- *R. oryzae* je transformirala trop grožđa, smanjujući njegovu masu za 17,58 % nakon 15. dana SSF-a u laboratorijskim staklenkama što upućuje na činjenicu da se SSF-om pomoću *R. oryzae* može reducirati količina tropa grožđa kao i ostalih, po kemijskom sastavu sličnih, proizvodnih ostataka što je u skladu sa *zero-waste* konceptom.
  - Na temelju analize kemijskog sastava i dobivenih rezultata zaključeno je da je *R. oryzae* tijekom rasta na tropu grožđa koristila nutrijente iz supstrata za svoj metabolizam što je rezultiralo smanjenjem udjela šećera, proteina, pojedinih elemenata, ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti dok se udio ligninoceluloznih komponenti povećao tijekom 15 dana SSF-a. Navedeno upućuje na to da *R. oryzae* nije potrošila sve lako dostupne hranjive tvari iz supstrata te nije u potpunosti počela razgrađivati lignocelulozne komplekse u svrhu opskrbe hranjivim tvarima i energijom pri čemu bi se istovremeno oslobodile i komponente poput fenolnih tvari sadržane u lignoceluloznoj strukturi. Stoga je za prepostaviti da se SSF proces pomoću navedene gljive treba provoditi duži period od ispitivanog.



- Također je zaključeno da je razlog prividnog povećanja udjela pojedinih frakcija lignina, celuloze i hemiceluloze razgradnja ostalih lako dostupnih komponenti supstrata koje gljiva najprije konzumira, a smanjenje udjela hemiceluloze nakon SSF-a u laboratorijskim staklenkama posljedica je djelovanja enzima ksilanaze (čija je prisutnost potvrđena tijekom fermentacije tropa grožđa s *R. oryzae*) koji djeluje na razgradnju ksilana (glavne jedinice hemiceluloze).
- Analizama teških metala, poliaromatskih ugljikovodika i polikloriranih bifenila u uzorcima tropa grožđa utvrđeno je da trop grožđa ne sadrži štetne tvari i može se potencijalno koristiti kao dodatak u proizvodnji hrane za životinje.
- Na temelju analize koncentracije biomase i dobivenih rezultata zaključeno je da bi produljenje SSF-a pridonijelo učinkovitijoj razgradnji lignoceluloznih komponenti i proizvodnji visokovrijednih produkata budući da je uočen eksponencijalni rast koncentracije biomase sve do 15. dana SSF-a.
- Ponovljena SSF s *R. oryzae* uz primjenu tropa grožđa sorte frankovka 2017. kao supstrata te uvećanje mjerila SSF procesa u bioreaktoru s pliticama utjecali su na povećanje prinosa 11 fenolnih spojeva (galne, elaginske, *p*-hidroksibenzojeve, sringinske, vanilinske i 3,4-dihidroksibenzojeve kiseline, *p*-kumarinske kiseline, kafeinske kiseline, epikatehin galata, kvercetin i resveratrola za 1,5-, 1,1-, 2,4-, 1,8-, 1,2-, 2,1-, 1,1-, 1,1-, 1,1-, 1,6- i 1,0 puta u laboratorijskim staklenkama te za 1,6-, 1,1-, 1,9-, 1,2-, 1,2-, 1,7-, 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,8- i 2,5 puta u bioreaktoru s pliticama) te se može zaključiti da SSF predstavlja potencijalnu tehnologiju za proizvodnju visokovrijednih produkata kao što su fenolni spojevi.
- Na temelju analize aktivnosti hidrolitičkih ( $\beta$ -glukozidaza, ksilanaza, celulaza, invertaza) i lignolitičkih enzima (lakaza, MnP, LiP) zaključeno je da *R. oryzae* tijekom rasta na tropu grožđa proizvodi sve navedene enzime. Također se može zaključiti da su relativno niske aktivnosti enzima rezultat rasta *R. oryzae* na supstratu (tropu grožđa) s visokim C/N omjerom koji bi bilo poželjno regulirati prije početka SSF-a te produžiti vrijeme trajanja SSF-a kako bi se postigle veće aktivnosti enzima, a samim time i učinkovitija razgradnja lignocelulozne biomase.
- Iz rezultata korelacije između enzima i fenolnih tvari može se zaključiti da enzimska aktivnost ispitivanih enzima nije nužno proporcionalna povećanju prinosa fenolnih tvari iz tropa grožđa.
- Uvećanje mjerila s 50 g korištenog tropa grožđa u laboratorijskim staklenkama na 1150 g tropa grožđa po jednoj plitici u bioreaktoru s pliticama uspješno je provedeno s obzirom na kontinuirano održavanje temperature tijekom procesa u bioreaktoru i udjela

vlage biomase u rasponu optimalnom za rast mikroorganizma tijekom čitavog trajanja procesa te ostvarene slične prinose pojedinačnih fenolnih spojeva kao u laboratorijskim staklenkama.

## **6. LITERATURA**

- Adney B i Baker J: Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure (LAP), *Technical Report 11.*, 2008.
- Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD i Valéro JR: Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* – Liberation and extraction of phenolic antioxidants. *Food Chemistry* 126(3):1071–1080, 2011.
- AL Zahrani NA, El-Shishtawy RM i Asiri AM: Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 204:112609, 2020.
- Alara OR, Abdurahman NH i Ukaegbu CI: Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science* 4:200–214, 2021.
- Alarcón E, Hernández C, García G, Ziarelli F, Gutiérrez-Rivera B, Musule R, Vázquez-Marrufo G i Gardner TG: Changes in chemical and structural composition of sugarcane bagasse caused by alkaline pretreatments [Ca(OH)<sub>2</sub> and NaOH] modify the amount of endoglucanase and β-glucosidase produced by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Chemical Engineering Communications* 209(5):594–606, 2021.
- Almagro L, Belchi-Navarro S, Belen Sabater-Jara A, Vera-Urbina JC, Selles-Marchart S, Roque B i Angeles Pedreno M: Bioproduction of trans-Resveratrol from Grapevine Cell Cultures. U Ramawat KG i Mérillon J-M (ur.): *Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpene*, str. 1683–1713, Springer, Berlin Heidelberg, 2013.
- Amaya-Chantaca D, Flores-Gallegos AC, Iliná A, Aguilar CN, Sepúlveda-Torre L, Ascacio-Vadlós JA i Chávez-González ML: Comparative extraction study of grape pomace bioactive compounds by submerged and solid-state fermentation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 97:1494–1505, 2022.
- Amaro-Reyes A, Gracida J, Huizache-Peña N, Elizondo-García N, Salazar-Martínez J, García Almendárez BE i Regalado C: On-site hydrolytic enzymes production from fungal co-cultivation of Bermuda grass and corn cob. *Bioresource Technology* 212:334–337, 2016.
- Antonić B, Jančíková S, Dordević D i Tremlová B: Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods* 9(11):1627, 2020.
- AOAC: Association of Official Analytical Chemists, *AOAC Official Method 945.16. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 18th ed.*; AOAC International, Gaithersburg, SAD, 2005.
- AOAC: Association of Official Analytical Chemists, *AOAC Official Method 942.05 Ash of Animal Feed-Methods of AOAC-International-Food Laws & Regulations-Documents-Global FoodMate*. [http://files.foodmate.com/2013/files\\_2718.html](http://files.foodmate.com/2013/files_2718.html), 2022a.
- AOAC: Association of Official Analytical Chemists, *AOAC Official Method 2001.11 Protein (Crude) in Animal Feed, Forage (Plant Tissue), Grain, and Oilseeds*, 2022b.
- Applegate KB, Cheek PR i Inlow JK: Analysis of kombucha to teach biochemical concepts and techniques to undergraduate students. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 47(4):459–467, 2019.
- Arora S, Dubey M, Singh P, Rani R i Ghosh S: Effect of mixing events on the production of a thermo-tolerant and acid-stable phytase in a novel solid-state fermentation bioreactor. *Process Biochemistry* 61:12–23, 2017.
- Arora S, Rani R i Ghosh S: Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. *Journal of Biotechnology* 269:16–34, 2018.

- Avallone R, Plessi M, Baraldi M i Monzani A: Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of Food Composition and Analysis* 10(2):166–172, 1997.
- Bai Z, Jin B, Li Y, Chen J i Li Z: Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Sciences* 20(3), 353–358, 2008.
- Bailey MJ, Biely P i Poutanen K: Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* 23(3):257–270, 1992.
- Balwan WK, Singh A i Kour S: 5R's of zero waste management to save our green planet: A narrative review. *European Journal of Biotechnology and Bioscience* 10(1):7–11, 2022.
- Barbanera M: Valorization of winery and distillery by-products by hydrothermal carbonization. *Scientific Reports* 11:23973, 2021.
- Barreira JCM, Oliveira MBPP i Ferreira ICFR: Development of a Novel Methodology for the Analysis of Ergosterol in Mushrooms. *Food Analytical Methods* 7(1):217–223, 2014.
- Baslyman W: Microwave-assisted Dehydration of Fructose into 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) over Acidic Porous Catalysts. *Diplomski rad*. Sveučilište u Ottawi, Ontario, 2015.
- Bastos RG i Ribeiro HC: Citric Acid Production by the Solid-State Cultivation Consortium of and from Sugarcane Bagasse. *The Open Biotechnology Journal* 14(1):32-41, 2020.
- Batool S, Asgher M, Sheikh MA i Rahman SU: Optimization of physical and nutritional factors for enhanced production of lignin peroxidase by *Ganoderma lucidum* IBL-05 in solid state culture of wheat straw. *Journal of Animal and Plant Sciences* 23(4):1166-1176, 2013.
- Beaumont P, Courtois A, Atgié C, Richard T i Krisa S: In the shadow of resveratrol: Biological activities of epsilon-viniferin. *Journal of Physiology and Biochemistry* 78:465-484, 2022.
- Behera SS, Ray RC, Das U, Panda S i Saranraj P: Microorganisms in Fermentation. U Berenjian A (ur.): *Essentials in Fermentation Technology. Learning Materials in Biosciences*, str. 1–39, Springer, Cham, Švicarska, 2019.
- Behr M, Sergeant K, Leclercq CC, Planchon S, Guignard C, Lenouvel A, Renaut J, Hausman J-F, Lutts S i Guerriero G: Insights into the molecular regulation of monolignol-derived product biosynthesis in the growing hemp hypocotyl. *BMC Plant Biology* 18(1):1-18, 2018.
- Benabda O, M'hir S, Kasmi M, Mnif W i Hamdi M: Optimization of Protease and Amylase Production by *Rhizopus oryzae* Cultivated on Bread Waste Using Solid-State Fermentation. *Journal of Chemistry* 2019:1–9, 2019.
- Benbougerra N, Hornedo-Ortega R, Garcia F, El Khawand T, Saucier C i Richard T: Stilbenes in grape berries and wine and their potential role as anti-obesity agents: A review. *Trends in Food Science & Technology* 112:362–381, 2021.
- Benvenuti S, Pellati F, Melegari M i Bertelli D: Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes, and Aronia. *Journal of Food Science* 69(3):164-169, 2006.
- Benzie IFF, Strain JJ: The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 239:70–76, 1996.
- Bordiga M, Travaglia F i Locatelli M: Valorisation of grape pomace: An approach that is increasingly reaching its maturity – a review. *International Journal of Food Science and Technology* 54:933-942, 2019.

- Botella C, Diaz A, de Ory I, Webb C i Blandino A: Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 42(1):98–101, 2007.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1):248–254, 1976.
- Brezoiu A-M, Bajenaru L, Berger D, Mitran R-A, Deaconu M, Lincu D, Stoica Guzun A, Matei C, Moisescu MG i Negreanu-Pirjol T: Effect of Nanoconfinement of Polyphenolic Extract from Grape Pomace into Functionalized Mesoporous Silica on Its Biocompatibility and Radical Scavenging Activity. *Antioxidants* 9(8):696, 2020.
- Bucić-Kojić A: Utjecaj procesnih uvjeta i načina kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost fenolnih tvari iz sjemenki grožđa. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2008.
- Bucić-Kojić A, Fernandes F, Silva T, Planinić M, Tišma M, Šelo G, Šibalić D, Pereira DM i Andrade PB: Enhancement of the anti-inflammatory properties of grape pomace treated by *Trametes versicolor*. *Food & Function* 11(1):680–688, 2020.
- Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S i Tišma M: Trop grožđa - otpad i visokovrijedna sirovina. U Šubarić D (ur.): *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije*, str. 111–131, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, Hrvatska, 2017.
- Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Bilić M i Velić D: Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 81(1):236–242, 2007.
- Bucić-Kojić A, Šelo G, Zelić B, Planinić M i Tišma M: Recovery of Phenolic Acid and Enzyme Production from Corn Silage Biologically Treated by *Trametes versicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181(3):948–960, 2017.
- Bucić-Kojić A, Sovová H, Planinić M i Tomas S: Temperature-dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: Experiment and model. *Food Chemistry* 136(3–4), 1136–1140, 2013.
- Bucić-Kojić A, Tišma M, Šelo G, Grgić J, Perković G i Planinić M: Winery Production Residues as Feedstocks within the Biorefinery Concept. *Engineering Power: Bulletin of the Croatian Academy of Engineering* 17(1), 11–17, 2022.
- Buenrostro-Figueroa JJ, Velázquez M, Flores-Ortega O, Ascacio-Valdés JA, Huerta-Ochoa S, Aguilar CN i Prado-Barragán LA: Solid state fermentation of fig (*Ficus carica* L.) by-products using fungi to obtain phenolic compounds with antioxidant activity and qualitative evaluation of phenolics obtained. *Process Biochemistry* 62:16–23, 2017.
- Bustamante MA, Moral R, Paredes C, Pérez-Espinosa A, Moreno-Caselles J i Pérez-Murcia MD: Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management* 28(2):372–380, 2008.
- Caldas TW, Mazza KEL, Teles ASC, Mattos GN, Brígida AIS, Conte-Junior CA, Borguini RG, Godoy RLO, Cabral LMC i Tonon RV: Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products* 111:86–91, 2018.
- Casazza AA, Aliakbarian B, Sannita E i Perego P: High-pressure high-temperature extraction of phenolic compounds from grape skins: Grape skin polyphenols extraction. *International Journal of Food Science & Technology* 47(2):399–405, 2012.
- Ćeranić A: Izbor membranskih filtara za mjerenje otopljenog organskog ugljika. *Završni rad*. Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb, 2016.

- Chanioti S, Liadakis G i Tzia C: *Solid-Liquid Extraction*. U Varzakas T i Tzia C (ur.): *Food Engineering Handbook*, str. 253-286, CRC Press, Boca Raton, 2014.
- Chen B, Ke B, Ye L, Jin S, Jie F, Zhao L i Wu X: Isolation and varietal characterization of *Ganoderma resinaceum* from areas of *Ganoderma lucidum* production in China. *Scientia Horticulturae* 224:109–114, 2017.
- Chilakamarry CR, Mimi Sakinah AM, Zularisam AW, Sirohi R, Khilji IA, Ahmad N i Pandey A: Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology* 343:126065, 2022.
- Chowdhary P, Gupta A, Gnansounou E, Pandey A i Chaturvedi P: Current trends and possibilities for exploitation of Grape pomace as a potential source for value addition. *Environmental Pollution* 278:116796, 2021.
- Costa-Silva V, Anunciação M, Andrade E, Fernandes L, Costa A, Fraga I, Barros A, Marques G, Ferreira L i Rodrigues M: Biovalorization of Grape Stalks as Animal Feed by Solid State Fermentation Using White-Rot Fungi. *Applied Sciences* 12(13):6800, 2022.
- Das RK, Brar SK i Verma M: A fermentative approach towards optimizing directed biosynthesis of fumaric acid by *Rhizopus oryzae* 1526 utilizing apple industry waste biomass. *Fungal Biology* 119(12):1279–1290, 2015.
- Daud N 'Aliah, Sarbini, SR, Babji AS, Mohamad Yusop S i Lim SJ: Characterization of edible swiftlet's nest as a prebiotic ingredient using a simulated colon model. *Annals of Microbiology* 69(12):1235–1246, 2019.
- de Borba VS, Lemos AC, Rodrigues MHP, Gropelli VM, Cerqueira MBR i Badiale-Furlong E: Miniaturization of Spectrophotometric Methods to Determine Reducing Sugars, Total Starch and Soluble Proteins in Wheat-Based Products. *Food Analytical Methods*, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02330-2>.
- Dias MC, Pinto DCGA i Silva AMS: Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules* 26(17):5377, 2021.
- Díaz AB, Alvarado O, de Ory I, Caro I i Blandino A: Valorization of grape pomace and orange peels: Improved production of hydrolytic enzymes for the clarification of orange juice. *Food and Bioproducts Processing* 91(4):580–586, 2013.
- Drevelegka I i Goula AM: Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* 149:107845, 2020.
- Dulf FV, Vodnar DC, Dulf E-H, Diaconeasa Z i Socaciu C: Liberation and recovery of phenolic antioxidants and lipids in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) pomace by solid-state bioprocessing using *Aspergillus niger* and *Rhizopus oligosporus* strains. *LWT - Food Science and Technology* 87:241–249, 2018.
- Dulf FV, Vodnar DC, Dulf E-H i Pinteau A: Phenolic compounds, flavonoids, lipids and antioxidant potential of apricot (*Prunus armeniaca* L.) pomace fermented by two filamentous fungal strains in solid state system. *Chemistry Central Journal* 11(1):92, 2017.
- Dulf FV, Vodnar DC i Socaciu C: Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. *Food Chemistry* 209:27–36, 2016.
- Dulf FV, Vodnar DC, Toşa MI i Dulf E-H: Simultaneous enrichment of grape pomace with  $\gamma$ -linolenic acid and carotenoids by solid-state fermentation with *Zygomycetes* fungi and

- antioxidant potential of the bioprocessed substrates. *Food Chemistry* 310:125927, 2020.
- Durazzo A, Lucarini M, Camilli E, Marconi S, Gabrielli P, Lisciani S, Gambelli L, Aguzzi A, Novellino E, Santini A, Turrini A i Marletta L: Dietary Lignans: Definition, Description and Research Trends in Databases Development. *Molecules* 23(12):3251, 2018.
- Dwyer K, Hosseinian F i Rod M: The Market Potential of Grape Waste Alternatives. *Journal of Food Research* 3(2):1-16, 2014.
- EFSA, European Food Safety Authority: *Scientific Opinion on the evaluation of the substances currently on the list in the Annex to Commission Directive 96/3/EC as acceptable previous cargoes for edible fats and oils – Part I of III*. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2482>, 2011.
- El Gharras H: Polyphenols: Food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science & Technology* 44(12):2512–2518, 2009.
- El-Bakry M, Abraham J, Cerda A, Barrena R, Ponsá S, Gea T i Sánchez A: From Wastes to High Value Added Products: Novel Aspects of SSF in the Production of Enzymes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 45(18):1999–2042, 2015.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Tsiklauri N, Metreveli E, Khardziani T i Agathos SN: Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25(2):331–339, 2009.
- Eur-LEX. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on Undesirable Substances in Animal Feed. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2002/32/2019-11-28> [28. 6. 2022.]
- Evtugin DD, Magina S i Evtugin DV: Recent Advances in the Production and Applications of Ellagic Acid and Its Derivatives. A Review. *Molecules* 25(12):2745, 2020.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> [19. 6. 2022.]
- Feitosa PRB, Santos TRJ, Gualberto NC, Narain N i de Aquino Santana LCL: Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* for the bio-enrichment of bioactive compounds in *Moringa oleifera* (moringa) leaves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 27:101709, 2020.
- Fernandes JMC, Fraga I, Sousa RMOF, Rodrigues MAM, Sampaio A, Bezerra RMF i Dias A A: Pretreatment of Grape Stalks by Fungi: Effect on Bioactive Compounds, Fiber Composition, Saccharification Kinetics and Monosaccharides Ratio. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(16):5900, 2020.
- Ferreira JA, Lennartsson PR, Edebo L i Taherzadeh MJ: Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. *Bioresource Technology* 135:523–532, 2013.
- Ferreira M, Fernandes H, Peres H, Oliva-Teles A, Belo I i Salgado JM: Bio-enrichment of oilseed cakes by *Mortierella alpina* under solid-state fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 134:109981, 2012.
- Ferreira M, Fernandes H, Peres H, Oliva-Teles A, Belo I i Salgado JM: Polyunsaturated fatty acids production by solid-state fermentation on polyurethane foam by *Mortierella alpina*. *Biotechnology Progress* 37(3):1-12, 2021.
- Field JA, Vledder RH, van Zelst JG i Rulkens WH: The tolerance of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase to miscible solvents and the in vitro oxidation of anthracene in solvent: Water mixtures. *Enzyme and Microbial Technology* 18(4):300–308, 1996.



- Filipe D, Fernandes H, Castro C, Peres H, Oliva-Teles A, Belo I i Salgado JM: Improved lignocellulolytic enzyme production and antioxidant extraction using solid-state fermentation of olive pomace mixed with winery waste. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 14(1):78–91, 2020.
- Filippi K, Georgaka N, Alexandri M, Papapostolou H i Koutinas A: Valorisation of grape stalks and pomace for the production of bio-based succinic acid by *Actinobacillus succinogenes*. *Industrial Crops and Products* 168:113578, 2021.
- Fokunang ET, Annih MG, Abongwa LE, Bih ME, Vanessa TM, Fomnboh DJ i Fokunang C: Medicinal Mushroom of Potential Pharmaceutical Toxic Importance: Contribution in Phytotherapy, <https://www.intechopen.com/online-first/81313>, 2022.
- Gaind S: Exploitation of Orange Peel for Fungal Solubilization of Rock Phosphate by Solid State Fermentation. *Waste and Biomass Valorization* 8(4):1351–1360, 2017.
- Gautério GV, da Silva LGG, Hübner T, Ribeiro TR i Kalil SJ: Xylooligosaccharides production by crude and partially purified xylanase from *Aureobasidium pullulans*: Biochemical and thermodynamic properties of the enzymes and their application in xylan hydrolysis. *Process Biochemistry* 104:161–170, 2021.
- Gervasi T, Calderaro A, Barreca D, Tellone E, Trombetta D, Ficarra S, Smeriglio A, Mandalari G i Gattuso G: Biotechnological Applications and Health-Promoting Properties of Flavonols: An Updated View. *International Journal of Molecular Sciences* 23(3):1710, 2022.
- Ghose TK: Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59(2):257–268, 1987.
- Gil-Martín E, Forbes-Hernández T, Romero A, Cianciosi D, Giampieri F i Battino M: Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. *Food Chemistry* 378:131918, 2022.
- Giovanazzi Sermanni G i Tiso N: Aspects of Designs of Bioreactors in SSF. U Pandey A, Soccol CR i Larroche C (ur.): *Current Developments in Solid-state Fermentation*, str. 117–145, Springer, New Delhi, India, 2007.
- Goering HK i Soest PJV: *Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications)*, U. S. Government Printing Office, Agricultural Research Service, Washington, str. 1-24, 1970.
- Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R i Palazon J: Phenolic acids. In Ramawat KG i Mérillon J-M (ur.): *Natural Products Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpene*, str. 1951–1973, Springer, Berlin Heidelberg, 2013.
- Grgič I, Podgornik H, Berovič M i Perdih A: Improvements in the determination of manganese peroxidase activity. *Biotechnology Letter* 23:1039–1042, 2001.
- Grgić J, Šelo G, Planinić M, Tišma M i Bucić-Kojić A: Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. *Antioxidants* 9(10):923, 2020.
- Gurgenidze L, Kanchaveli T, Kvartskhava G, Gurgenidze L, Kanchaveli T i Kvartskhava G: Selecting optimal parameters for obtaining the extract of red grape pomace. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 75(1):9831–9837, 2022.
- Hamdan NT i Jasim HM: Cellulase from *Trichoderma longibrachiatum* fungus: A review. *World Bulletin of Public Health* 4:1-17, 2021.
- Heim KE, Tagliaferro AR i Bobilya DJ: Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13(10):572–584, 2022.

- Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B i Eijsink V: Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels* 5(1):45, 2012.
- Hoss I, Rajha HN, El Khoury R, Youssef S, Manca ML, Manconi M, Louka N i Maroun RG: Valorization of Wine-Making By-Products' Extracts in Cosmetics. *Cosmetics* 8(4):109, 2021.
- Iandolo D, Piscitelli A, Sannia G i Faraco V: Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 163(1), 40–51, 2011.
- Ibarra-Cantún D, Ramos-Cassellis ME, Marín-Castro MA i Castelán-Vega RC: Secondary Metabolites and Antioxidant Activity of the Solid-State Fermentation in Apple (*Pirus malus* L.) and Agave Mezcalero (*Agave angustifolia* H.) Bagasse. *Journal of Fungi*, 6(3):137, 2020.
- Ingole A, Kadam MP, Dalu AP, Kute SM, Mange PR, Theng VD, Lahane OR, Nikas AP, Kawal YV, Nagrik SU i Patil PA: A Review of the Pharmacological Characteristics of Vanillic Acid. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 11(2-S):200–204, 2021.
- Jolić N: *Antioksidacijska aktivnost fenola: Interakcija derivata hidroksibenzojeve kiseline. Završni rad.* Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2017.
- Kalli E, Lappa I, Bouchagier P, Tarantilis PA i Skotti E: Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresources and Bioprocessing* 5(1):46, 2018.
- Kammerer DR, Kammerer J, Valet R i Carle R: Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. *Food Research International* 65:2–12, 2014.
- Karimi S, Mahboobi Soofiani N, Mahboubi A i Taherzadeh M: Use of Organic Wastes and Industrial By-Products to Produce Filamentous Fungi with Potential as Aqua-Feed Ingredients. *Sustainability* 10(9):3296, 2018.
- Karpe AV, Dhamale VV, Morrison PD, Beale DJ, Harding IH i Palombo EA: Winery biomass waste degradation by sequential sonication and mixed fungal enzyme treatments. *Fungal Genetics and Biology* 102:22–30, 2016.
- Khiari B i Jeguirim M: Pyrolysis of Grape Marc from Tunisian Wine Industry: Feedstock Characterization, Thermal Degradation and Kinetic Analysis. *Energies* 11:730, 2018.
- Kumar N i Goel N: Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* 24:e00370, 2019.
- Kumar V, Ahluwalia V, Saran S, Kumar J, Patel AK i Singhanian RR: Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. *Bioresource Technology* 323:124566, 2021.
- Kupski L, Cicolatti E, Rocha M, Oliveira MS, Souza-Soares LA i Badiale-Furlong E: Solid-state fermentation for the enrichment and extraction of proteins and antioxidant compounds in rice bran by *Rhizopus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55(6), 937–942, 2012.
- Larios-Cruz R, Buenrostro-Figueroa J, Prado-Barragán A, Rodríguez-Jasso RM, Rodríguez-Herrera R, Montañez JC i Aguilar CN: Valorization of Grapefruit By-Products as Solid Support for Solid-State Fermentation to Produce Antioxidant Bioactive Extracts. *Waste and Biomass Valorization* 10(4):763–769, 2019.
- Leite P, Silva C, Salgado JM i Belo I: Simultaneous production of lignocellulolytic enzymes and extraction of antioxidant compounds by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Industrial Crops and Products* 137:315–322, 2019.

- Lessa OA, Reis NS, Leite SGF, Gutarra MLE, Souza AO, Gualberto SA, de Oliveira JR, Aguiar-Oliveira E i Franco M: Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. *Food Science and Biotechnology* 27(1):107–113, 2018.
- Li G i Row KH: Deep eutectic solvents cross-linked molecularly imprinted chitosan microsphere for the micro-solid phase extraction of *p*-hydroxybenzoic acid from pear rind. *Journal of Separation Science* 44(2), 549–556, 2021.
- Linko S i Haapala R: A critical study of lignin peroxidase activity assay by veratryl alcohol oxidation. *Biotechnology Techniques* 7(1):75–80, 1993.
- Liu X, Yu X, Zhang T, Wang Z, Xu J, Xia J, He A, Yan Y i Xu J: Novel two-stage solid-state fermentation for erythritol production on okara–buckwheat husk medium. *Bioresource Technology* 266:439–446, 2018.
- Londoño-Hernández L, Ramírez-Toro C, Ruiz HA, Ascacio-Valdés JA, Aguilar-Gonzalez MA, Rodríguez-Herrera R i Aguilar CN: *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International Journal of Food Microbiology* 257:110–127, 2017.
- Lopes VRO, Farias MA, Belo IMP i Coelho MAZ: Nitrogen sources on TPOMW valorization through solid state fermentation performed by *Yarrowia lipolytica*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 33(2):261–270, 2016.
- López-Pérez M i Viniestra-González G: Production of protein and metabolites by yeast grown in solid state fermentation: Present status and perspectives. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 91(5):1224–1231, 2016.
- Lovrić S: Fiziološka i ekološka značajnost fenolnih spojeva u biljci. *Završni rad*. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 2014.
- Lubbers RJM i de Vries RP: Production of Protocatechuic Acid from *p*-Hydroxyphenyl (H) Units and Related Aromatic Compounds Using an *Aspergillus niger* Cell Factory. *Applied and Industrial Microbiology* 12(3):e0039121, 2021.
- Lueangjaroenkit P, Kunitake E, Sakka M, Kimura T, Teerapatsakul C, Sakka K i Chitradon L: Light Regulation of Two New Manganese Peroxidase-Encoding Genes in *Trametes polyzona* KU-RNW027. *Microorganisms* 8(6):852, 2020.
- Maluf DF, Gonçalves M, D'Angelo R, Girassol A, Tulio A, Pupo Y i Farago P: Cytoprotection of Antioxidant Biocompounds from Grape Pomace: Further Exfoliant Phytoactive Ingredients for Cosmetic Products. *Cosmetics* 5(3):46, 2018.
- Manara P, Zabaniotou A, Vanderghem C i Richel A: Lignin extraction from Mediterranean agro-wastes: Impact of pretreatment conditions on lignin chemical structure and thermal degradation behavior. *Catalysis Today* 223:25–34, 2014.
- Margetić A i Vujčić Z: Comparative study of stability of soluble and cell wall invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 47(3):305–311, 2017.
- Marinova D, Ribarova F i Atanassova M: Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40(3):255-260, 2005.
- Martínez O, Sánchez A, Font X i Barrena R: Valorization of sugarcane bagasse and sugar beet molasses using *Kluyveromyces marxianus* for producing value-added aroma compounds via solid-state fermentation. *Journal of Cleaner Production* 158:8–17, 2017.

- Martins ES, Silva D, Da Silva R i Gomes E: Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry* 37(9), 949–954, 2002.
- Masui DC, Zimbardi ALRL, Souza FHM, Guimarães LHS, Furriel RPM i Jorge JA: Production of a xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *Thermoidea* under solid state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(8):2689–2701, 2012.
- Mehta N, Jeyapriya S, Kumar P, Kumar Verma A, Umaraw P, Kumar Khatkar S, Boora Khatkar A, Pathak D, Kaka U i Qurni Sazili A: Ultrasound-Assisted Extraction and the Encapsulation of Bioactive Components for Food Applications. *Foods* 11:2973, 2022.
- Meini M-R, Cabezudo I, Galetto CS i Romanini D: Production of grape pomace extracts with enhanced antioxidant and prebiotic activities through solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Food Bioscience* 42:101168, 2021.
- Melanouri E-M, Dedousi M i Diamantopoulou P: Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. *Carbon Resources Conversion* 5(1):61–70, 2022.
- Mikucka W, Zielinska M, Bulkowska K i Witonska I: Recovery of polyphenols from distillery stillage by microwave-assisted, ultrasound-assisted and conventional solid-liquid extraction. *Scientific Reports* 12(1):3232, 2022.
- Milaković M: Mikrovalno potpomognuta ekstrakcija benzoilcikloheksanonskih i benzoilpirazolnog herbicida iz poljoprivrednog tla. *Diplomski rad*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2016.
- Miletić V: Spektrofotometrijsko određivanje polifenola izoliranih iz kore rajčice ultrazvukom visokog intenziteta. *Završni rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2017.
- Miller GL: Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):426–428, 1959.
- Mitchell DA, Berović M i Krieger N: Introduction to Solid-State Fermentation Bioreactors. U Mitchell DA, Krieger N i Berović M (ur.): *Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*, str. 33–44, Springer, Berlin Heidelberg, Njemačka, 2006c.
- Mitchell DA i Krieger N: Solid-State Cultivation Bioreactors. U Berenjian A (ur.): *Essentials in Fermentation Technology. Learning Materials in Biosciences*, str. 105–133, Springer, Cham, Švicarska, 2019.
- Mitchell DA, Krieger N i Berović M: Group I Bioreactors: Un-aerated and Unmixed. U Mitchell DA, Krieger N i Berović M (ur.): *Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*, str. 65–76, Springer, Berlin Heidelberg, Njemačka, 2006d.
- Mitchell DA, Krieger N i Berović M: Solid-State Fermentation Bioreactor Fundamentals: Introduction and Overview. U Mitchell DA, Krieger N i Berović M (ur.): *Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation*, str. 1–12, Springer, Berlin Heidelberg, Njemačka, 2006.
- Mitchell DA, Krieger N i Berović M: Substrate, Air, and Thermodynamic Parameters for SSF Bioreactor Models. U Mitchell DA, Krieger N i Berović M (ur.): *Solid-state fermentation bioreactors: Fundamentals of design and operation*, str. 265–278, Springer, Berlin Heidelberg, Njemačka, 2006a.
- Mitchell DA, Krieger N, Berović M i Luz LFL: Group IVa: Continuously-Mixed, Forcefully Aerated Bioreactors. U Mitchell DA, Krieger N i Berović M (ur.): *Solid-State*

- Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*, str. 115–128, Springer, Berlin Heidelberg, Njemačka, 2006g.
- Mitchell DA, Srinophakun P, Krieger N i von Meien OF: Group II Bioreactors: Forcefully-Aerated Bioreactors Without Mixing. U Mitchell DA, Krieger N i Berovič M (ur.): *Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*, str. 77–94, Springer, Berlin Heidelberg, Njemačka, 2006e.
- Mitchell DA, Stuart DM i Hardin MT: Group III: Rotating-Drum and Stirred-Drum Bioreactors. U Mitchell DA, Krieger N i Berovič M (ur.): *Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*, str. 95–114, Springer, Berlin Heidelberg, Njemačka, 2006f.
- Mitchell DA, von Meien OF, Luz Jr LFL i Berovič M: The Scale-up Challenge for SSF Bioreactors. U Mitchell DA, Krieger N i Berovič M (ur.): *Solid-State Fermentation Bioreactors. Fundamentals of Design and Operation*, str. 57–64, Springer, Berlin Heidelberg, Njemačka, 2006b.
- Morazzoni P, Vanzani P, Santinello S, Gucciardi A, Zennaro L, Miotto G i Ursini F: Grape Seeds Proanthocyanidins: Advanced Technological Preparation and Analytical Characterization. *Antioxidants* 10(3):418, 2021.
- Moro KIB, Bender ABB, da Silva LP i Penna NG: Green Extraction Methods and Microencapsulation Technologies of Phenolic Compounds From Grape Pomace: A Review. *Food and Bioprocess Technology* 14(8):1407–1431, 2021.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, José Núñez M i Parajó JC: Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72(2):145–171, 2001.
- Muñoz P, Morales MP, Mendivil MA, Juárez MC i Muñoz L: Using of waste pomace from winery industry to improve thermal insulation of fired clay bricks. Eco-friendly way of building construction. *Construction and Building Materials* 71:181–187, 2014.
- Muñoz-Bernal ÓA, Coria-Oliveros AJ, de la Rosa LA, Rodrigo-García J, del Rocío Martínez-Ruiz N, Sayago-Ayerdi SG i Alvarez-Parrilla E: Cardioprotective effect of red wine and grape pomace. *Food Research International* 140:110069, 2021.
- Mushollaeni W i Tantalul L: Anthocyanin and Nutritional Contents of Fermented Lebu Bean (*Cajanus* sp.) through SSF Method and Induced by *Rhizopus* sp. and *Saccharomyces* sp. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 465:012037, 2020.
- Naczki M i Shahidi F: Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054(1–2):95–111, 2004.
- Naser S, Saber W, El-Metwally M, Moustafa M i El-Kott A: Fungal assembly of L-asparaginase using solid-state fermentation: a review. *BIOCELL* 44(2):147–155, 2020.
- Niu D, Zuo S, Jiang D, Tian P, Zheng M i Xu C: Treatment using white rot fungi changed the chemical composition of wheat straw and enhanced digestion by rumen microbiota in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 237:46–54, 2018.
- Ozcirak Ergun S i Ozturk Urek R: Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science* 15(2):273–277, 2017.
- Padilla-González GF, Grosskopf E, Sadgrove NJ i Simmonds MSJ: Chemical Diversity of Flavan-3-Ols in Grape Seeds: Modulating Factors and Quality Requirements. *Plants* 11(6):809, 2022.
- Pandey A, Larroche C i Soccol CR: General Consideration about Solid-state Fermentation Processes. U Pandey A, Soccol CR i Larroche C (ur.): *Current Developments in Solid-state Fermentation*, str. 13–26, Springer, Asiatech Publishers, INC., New Delhi, 2008.

- Papadaki A, Kachrimanidou V, Papanikolaou S, Philippoussis A i Diamantopoulou P: Upgrading Grape Pomace through *Pleurotus* spp. Cultivation for the Production of Enzymes and Fruiting Bodies. *Microorganisms* 7(7):207, 2019.
- Park S, Baker JO, Himmel ME, Parilla PA i Johnson DK: Cellulose crystallinity index: Measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels* 3(1):1-10, 2010.
- Patel H, Gupte A i Gupte S: Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a Basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under Solid state fermentation. *BioResources* 4(1):268–284, 2009.
- Pathania S, Sharma N i Handa S: Utilization of horticultural waste (Apple Pomace) for multiple carbohydrase production from *Rhizopus delemar* F 2 under solid state fermentation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16(1):181–189, 2018.
- Peralta RM, da Silva BP, Gomes Côrrea RC, Kato CG, Vicente Seixas FA i Bracht A: Enzymes from Basidiomycetes-Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. U Brahmachari G (ur.): *Biotechnology of Microbial Enzymes*, str. 119–149, Elsevier, 2017.
- Pinheiro VE, Michelin M, Vici AC, de Almeida PZ i Teixeira de Moraes Polizeli ML: *Trametes versicolor* laccase production using agricultural wastes: A comparative study in Erlenmeyer flasks, bioreactor and tray. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 43(3):507–514, 2020.
- Pourkhanali K, Khayati G, Mizani F i Raouf F: Isolation, identification and optimization of enhanced production of laccase from *Galactomyces geotrichum* under solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 51(7):659–668, 2021.
- Planinić M, Zelić B, Čubel I, Bucić-Kojić A i Tišma M: Corn forage biological pretreatment by *Trametes versicolor* in a tray bioreactor. *Waste Management & Research* 34(8) 802–809, 2016.
- Purohit JS, Dutta JR, Kumar Nanda R i Banerjee R: Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology* 97:795–801, 2006.
- Qureshi AS, Khushk I, Ali CH, Chisti Y, Ahmad A i Majeed H: Coproduction of protease and amylase by thermophilic *Bacillus* sp. BBXS-2 using open solid-state fermentation of lignocellulosic biomass. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 8:146–151, 2016.
- Rajha HN, Darra NE, Vorobiev E, Louka N i Maroun RG: An Environment Friendly, Low-Cost Extraction Process of Phenolic Compounds from Grape Byproducts. Optimization by Multi-Response Surface Methodology. *Food and Nutrition Sciences* 4:650-659, 2013.
- Rashad MM, Abdou HM i Mahmoud AE: Production of some bioactive materials by *Pleurotus ostreatus* from pineapple residues and rice straw via solid state fermentation. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences* 7(5):2730-2736, 2016.
- Ratner B: The correlation coefficient: Its values range between +1/–1, or do they? *Journal of Targeting, Measurement and Analysis for Marketing*, 17(2):139–142, 2009.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M i Rice-Evans C: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9):1231–1237, 1999.
- Rodríguez Couto S, López E i Sanromán MÁ: Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors. *Journal of Food Engineering* 74(2):263–267, 2006.
- Rodríguez-Couto S: Solid-State Fermentation for Laccases Production and Their Applications. U *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. *Current Advances in*

- Solid-State Fermentation*, str. 211–234, Elsevier, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00011-6>.
- Salar RK, Purewal SS i Bhatti MS: Optimization of extraction conditions and enhancement of phenolic content and antioxidant activity of pearl millet fermented with *Aspergillus awamori* MTCC-548. *Resource-Efficient Technologies* 2(3):148–157, 2016.
- Santos da Silveira J, Durand N, Lacour S, Belleville M-P, Perez A, Loiseau G i Dornier M: Solid-state fermentation as a sustainable method for coffee pulp treatment and production of an extract rich in chlorogenic acids. *Food and Bioproducts Processing* 115:175–184, 2019.
- Santos TR, Feitosa PR, Gualberto NC, Narain N i Santana LC: Improvement of bioactive compounds content in granadilla (*Passiflora ligularis*) seeds after solid-state fermentation. *Food Science and Technology International* 27(3):234–241, 2021.
- Saroj PPM i Narasimhulu K: Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. *Bioresources and Bioprocessing* 5(1):31, 2018.
- Schofield P, Mbugua DM i Pell AN: Analysis of condensed tannins: A review. *Animal Feed Science and Technology* 91(1–2):21–40, 2001.
- Şahin, T.; Dalğa, S.; Ölmez, M.; Şahin, T.; Dalğa, S.; Ölmez, M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Their Importance in Animal Nutrition; *IntechOpen*, ISBN 978-1-80355-127-2, 2022.
- Sen P, Nath A i Bhattacharjee C: Packed-Bed Bioreactor and Its Application in Dairy, Food, and Beverage Industry. U Larroche C, Ángeles Sanromán M, Du G, Pandey A (ur.): *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocesses, Bioreactors and Controls*, str. 235–277, Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, 2017.
- Shalaby A: Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 7(10):528–539, 2013.
- Sharma A, Vivekanand V i Singh RP: Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. *Bioresource Technology* 99(9):3444–3450, 2008.
- Sharma N, Tiwari N, Vyas M, Khurana N, Muthuraman A i Utreja P: An overview of therapeutic effects of vanillic acid. *Plant Archives* 20: 3053-3059, 2020.
- Shimadzu Corporation: TOC in daily practice, str. 1-36, [https://www.shimadzu.eu/sites/shimadzu.seg/files/5\\_toc\\_in\\_daily\\_practice\\_18a.pdf](https://www.shimadzu.eu/sites/shimadzu.seg/files/5_toc_in_daily_practice_18a.pdf) [28. 7. 2022].
- Shimadzu Corporation: Total Organic Carbon Analysis. Measurement of total nitrogen (TN) for protein estimation in pharmaceutical vaccines on the Shimadzu TOC-L with TNM-L. Application News No. O76, str. 1–2, 2020.
- Singh AK i Mukhopadhyay M: Overview of Fungal Lipase: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166(2):486–520, 2012.
- Singh S i Khajuria R: Regulation by Metal Ions. U Gupta VK i Pandey A (ur.): *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications*, str. 153–166, Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, 2019.
- Slaný O, Klemková T, Shapaval V, Zimmermann B, Kohler A i Čertík M: Biotransformation of Animal Fat-By Products into ARA-Enriched Fermented Bioproducts by Solid-State Fermentation of *Mortierella alpina*. *Journal of Fungi* 6(4):236, 2020.

- Soares M, Christen P, Pandey A i Soccol CR: Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 35(8):857–861, 2020.
- Sobal M, Martinez-Carrera D, Rio B i Roussos S: Screening of Edible Mushrooms for Polyphenol Degradation and Tannase Production from Coffee Pulp and Coffee Husk. U Roussos S, Soccol CR, Pandey A i Augur C (ur.): *New Horizons in Biotechnology*, str. 89–95, Springer, Dordrecht, Nizozemska, 2003.
- Souza PM i Magalhães PO: Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-A review. *Brazilian Journal of Microbiology* 41(4):850–861, 2010.
- Sova M i Saso L: Natural Sources, Pharmacokinetics, Biological Activities and Health Benefits of Hydroxycinnamic Acids and Their Metabolites. *Nutrients* 12(8):2190, 2020.
- Spagnuolo C, Napolitano M, Tedesco I, Moccia S, Milito A i Russo GL: Neuroprotective Role of Natural Polyphenols. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 16(17):1943–1950, 2016.
- Srinivasulu C, Ramgopal M, Ramanjaneyulu G, Anuradha CM i Suresh Kumar C: Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 108:547–557, 2018.
- Srivastava N, Srivastava M, Ramteke PW i Mishra PK: Solid-State Fermentation Strategy for Microbial Metabolites Production: An Overview. U Gupta VK i Pandey A (ur.): *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, str. 345–354, Elsevier, 2019.
- Stuedler S, Werner A i Walter T: It Is the Mix that Matters: Substrate-Specific Enzyme Production from Filamentous Fungi and Bacteria Through Solid-State Fermentation. U Stuedler S, Werner A i Cheng JJ (ur.): *Solid State Fermentation: Research and Industrial Applications*, str. 51–81, Springer, Cham, Švicarska, 2019.
- Stratil P, Klejdus B i Kubáň 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(3):607–616, 2006.
- Strelec I i Kovač T: *Praktikum iz biokemije*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2014.
- Suleiman W, El-Sheikh H, Abu-Elreesh G i Hashem A: Isolation and screening of promising oleaginous *Rhizopus* sp. And designing of Taguchi method for increasing lipid production. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences* 5(1):8–15, 2018.
- Šarić Mustapić D: Utjecaj flavonoida na metaboličku aktivnost enzima citokrom P450 u uvjetima in vitro. *Doktorska disertacija*. Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb 2020.
- Šelo G, Planinić M, Tišma M, Grgić J, Perković G, Koceva Komlenić D i Bucić-Kojić A: A Comparative Study of the Influence of Various Fungal-Based Pretreatments of Grape Pomace on Phenolic Compounds Recovery. *Foods* 11(11):1665, 2022.
- Šelo G, Planinić M, Tišma M, Tomas S, Koceva Komlenić D i Bucić-Kojić A: A Comprehensive Review on Valorization of Agro-Food Industrial Residues by Solid-State Fermentation. *Foods* 10(5):927, 2021.
- Šibalić D: Utjecaj uvjeta kruto-tekuće ekstrakcije na ekstraktibilnost šećera iz kukuruzne silaže. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2016.
- Šibalić D, Šalić A, Jurinjak Tušek A, Sokač T, Brekalo K, Zelić B, Tran NN, Hessel V i Tišma M: Sustainable production of lipase from *Thermomyces lanuginosus*: process



- optimization and enzyme characterization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59(48):21144-21154, 2020.
- Šibalić D, Šalić A, Tušek AJ, Sokač T, Brekalo K, Zelić B, Tran NN, Hessel V i Tišma M: Sustainable Production of Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Process Optimization and Enzyme Characterization. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 59(48):21144–21154, 2020.
- Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonič M i Knez Ž: Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 89(2):191–198, 2005.
- Tang C, Tan B i Sun X: Elucidation of Interaction between Whey Proteins and Proanthocyanidins and Its Protective Effects on Proanthocyanidins during In-Vitro Digestion and Storage. *Molecules* 26(18):5468, 2021.
- Teixeira A, Baenas N, Dominguez-Perles R, Barros A, Rosa E, Moreno D i Garcia-Viguera C: Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 15(9):15638–15678.
- Teles ASC, Chávez DWH, Oliveira RA, Bon EPS, Terzi SC, Souza EF, Gottschalk LMF i Tonon RV: Use of grape pomace for the production of hydrolytic enzymes by solid-state fermentation and recovery of its bioactive compounds. *Food Research International* 120:441-448, 2019.
- Teles ASC, Chávez DWH, Santiago MCPA, Gottschalk LMF i Tonon RV: Composition of different media for enzyme production and its effect on the recovery of phenolic compounds from grape pomace. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 35:102067, 2021.
- Tišma M, Jurić A, Bucić-Kojić A, Panjičko M i Planinić M: Biovalorization of brewers' spent grain for the production of laccase and polyphenols. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(2):182-186, 2018.
- Tišma M, Bucić-Kojić A i Planinić M: Bio-based Products from Lignocellulosic Waste Biomass: A State of the Art. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly* 35(2):139–156, 2021.
- Tišma M, Planinić M, Bucić-Kojić A, Panjičko M, Zupančič GD i Zelić B: Corn silage fungal-based solid-state pretreatment for enhanced biogas production in anaerobic co-digestion with cow manure. *Bioresource Technology* 253:220–226, 2018.
- Tišma M, Šalić A, Planinić M, Zelić B, Potočnik M, Šelo G i Bucić-Kojić A: Production, characterisation and immobilization of laccase for an efficient aniline-based dye decolourization. *Journal of Water Process Engineering* 36:101327, 2020.
- Tišma M, Žnidaršič-Plazl P, Šelo G, Tolj I, Šperanda M, Bucić-Kojić A i Planinić M: *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. *Bioresource Technology* 330:124997, 2021.
- Tournour HH, Segundo MA, Magalhães LM, Barreiros L, Queiroz J i Cunha LM: Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Industrial Crops and Products* 74:397–406, 2015.
- Troncozo MI, Figoli CB, Franco MEE, Mirífico MV, Bosch A, Rajchenberg M, Balatti PA i Saparrat MCN: Biotransformation of grape pomace from *Vitis labrusca* by *Peniophora albobadia* LPSC # 285 (Basidiomycota). *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 92(1):e20181174, 2020.
- Van Kuijk SJA, Sonnenberg ASM, Baars JJP, Hendriks WH i Cone JW: Fungal treatment of lignocellulosic biomass: Importance of fungal species, colonization and time on

- chemical composition and in vitro rumen degradability. *Animal Feed Science and Technology* 209:40–50, 2015.
- Visvanathan R, Qader M, Jayathilake C, Jayawardana BC, Liyanage R i Sivakanesan R: Critical review on conventional spectroscopic  $\alpha$ -amylase activity detection methods: Merits, demerits, and future prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(7):2836–2847, 2020.
- Wan C i Li Y: Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispota* for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresource Technology* 101(16):6398–6403, 2010.
- Wang J i Jiang Z: Synthesis, characterisation, antioxidant and antibacterial properties of *p*-hydroxybenzoic acid-grafted chitosan conjugates. *International Journal of Food Science & Technology* 57(2):1283–1290, 2022.
- Waterhouse AL: Determination of Total Phenolics. U Wrolstad RE (ur.): *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, str. I1.1.1-I1.1.8., John Wiley & Sons, New York, 2001.
- WHO: World Health Organization. *Regional Health Forum, Vol. 11, No. 1*. WHO Regional Office for South-East Asia. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/205775>, 2007.
- Xie P, Huang L, Zhang C, You F i Zhang Y: Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea* L.) with ultrasound assistance. *Food and Bioprocess Technology* 93:29–38, 2015.
- Xue Y-Q, Di J-M, Luo Y, Cheng K-J, Wei X i Shi Z: Resveratrol Oligomers for the Prevention and Treatment of Cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014:1–9, 2014.
- Yilmaz Y i Toledo RT: Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology* 15(9):422–433, 2004.
- Yilmazer C, Germec M i Turhan I: Solid-state fermentation for the production of a recombinant  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Aspergillus sojae* grown on renewable resources. *Journal of Food Processing and Preservation* 45(8):1-8, 2021.
- Yu H, Xie B, Khan R, Dong J i Shen G: The changes in macronutrients and microbial community structure during the co-composting of white wine distillers' grains and potassium silicate. *Journal of Cleaner Production* 319:128681, 2021.
- Zambrano C, Kotogán A, Bencsik O, Papp T, Vágvölgyi C, Mondal KC, Krisch J i Takó M: Mobilization of phenolic antioxidants from grape, apple and pitahaya residues via solid state fungal fermentation and carbohydrase treatment. *LWT - Food Science and Technology* 89:457–465, 2018.
- Zeko-Pivač A, Bošnjaković A, Planinić M, Parlov Vuković J, Novak P, Jednačak T i Tišma M. Improvement of the Nutraceutical Profile of Brewer's Spent Grain after Treatment with *Trametes versicolor*. *Microorganisms* 10:2295, 2022.
- Zduńska K, Dana A, Kolodziejczak A i Rotsztejn H: Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacology and Physiology* 31(6):332–336, 2018.
- Zhang X-Y, Chen J, Li X-L, Yi K, Ye Y, Liu G, Wang S-F, Hu H-L, Zou L i Wang Z-G: Dynamic changes in antioxidant activity and biochemical composition of tartary buckwheat leaves during *Aspergillus niger* fermentation. *Journal of Functional Foods* 32:375–381, 2017.
- Zheng Y, Lee C, Yu C, Cheng Y-S, Simmons CW, Zhang R, Jenkins BM i VanderGheynst JS: Ensilage and Bioconversion of Grape Pomace into Fuel Ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44):11128–11134, 2012.

- Zia S, Khan MR, Shabbir MA, Aslam Maan A, Khan MKI, Nadeem M, Khalil AA, Din A i Aadil RM: An Inclusive Overview of Advanced Thermal and Nonthermal Extraction Techniques for Bioactive Compounds in Food and Food-related Matrices. *Food Reviews International* 38(6):1166–1196, 2022.
- Zoghlami A i Paës G: Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in Chemistry* 7:874, 2019.