

# Proizvodnja hidrolitičkih enzima tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na pivskom tropu

---

Srdoč, Antun

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:617580>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-20**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Antun Srdoč**

**PROIZVODNJA HIDROLITIČKIH ENZIMA TIJEKOM UZGOJA *TRAMETES***  
***VERSICOLOR* NA PIVSKOM TROPU**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, lipanj 2023.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Kemijski i biokemijski reaktori  
**Tema rada:** Je prihvaćena na XI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 23. rujna 2022.  
**Mentor:** prof. dr. sc. *Marina Tišma*  
**Pomoć pri izradi:** *Anđela Zeko-Pivač*, mag.ing.proc.

### Proizvodnja hidrolitičkih enzima tijekom uzgoja *Trametes versicolor* na pivskom tropu

*Antun Srdoč*, 0129199690

#### Sažetak:

Pivski trop je široko rasprostranjen nusproizvod pivarske industrije. U ovom radu proučavan je proces proizvodnje hidrolitičkih enzima (ksilanaza, invertaza,  $\beta$ -glukozidaza i celulaza) u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, koristeći pivski trop kao supstrat za uzgoj *Trametes versicolor*. Fermentacija na čvrstim nosačima provedena je pri sljedećim procesnim uvjetima:  $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 15$  dana,  $m$  (supstrata) = 30 g, udio vlage = 69,19%, visina sloja: 4,5 cm. Gubitak na masi materijala nakon 15 dana fermentacije iznosio je 29%, a pH supstrata kretao se od 5,40 do 6,47. Maksimalne volumne aktivnosti enzima ksilanaze i invertaze postignute su nakon 15. dana. Volumna aktivnost ksilanaze bila je V.A. = 511,19 U/mL, a invertaze V.A. = 186,25 U/mL. Maksimalna volumna aktivnost  $\beta$ -glukozidaze postignuta je nakon 12. dana (V.A. = 4,34 U/mL), a celulaze nakon 10. dana (V.A. = 0,074 U/mL). Na temelju dobivenih rezultata dokazano je da je *T. versicolor* dobar mikroorganizam za proizvodnju istraživanih hidrolitičkih enzima tijekom uzgoja na pivskom tropu.

**Ključne riječi:** Pivski trop, *Trametes versicolor*, fermentacija na čvrstim nosačima, hidrolitički enzimi

**Rad sadrži:** 42 stranice  
17 slika  
2 tablice  
45 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

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

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

**Datum obrane:** 30. lipnja 2023.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Process engineering  
Subdepartment of Energy, Environment and Sustainable Development  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Chemical and biochemical reactors

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. XI. held on September 23, 2022.

**Mentor:** *Marina Tišma*, Full prof.

**Technical assistance:** *Anđela Zeko-Pivač*, mag.ing.proc.

### Production of Hydrolytic Enzymes During *Trametes versicolor* cultivation on Brewer's Spent Grain

*Antun Srdoč, 0129199690*

### Summary:

Brewer's spent grain is a widespread by-product of the brewing industry. In this work, the production process of hydrolytic enzymes (xylanase, invertase,  $\beta$ -glucosidase, and cellulase) was studied under solid-state fermentation (SSF) conditions, using brewer's spent grain as substrate for the cultivation of *Trametes versicolor*. Solid-state fermentation was performed under the following process conditions:  $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 15$  days,  $m$  (substrate) = 30 g, moisture content = 69.19%, layer height: 4.5 cm. The mass loss of the material after 15 days of fermentation was 29%, and the pH of the substrate ranged from 5.40 to 6.47. The highest volume activities of xylanase and invertase enzymes were reached after the 15th day, for xylanase V.A. = 511.19 U/mL and for invertase V.A. = 186.25 U/mL. The highest volume activity of  $\beta$ -glucosidase was reached after day 12, V.A. = 4.34 U/mL, and of cellulase after day 10, V.A. = 0.074 U/mL. Based on the obtained results, it was proved that *T. versicolor* is a suitable microorganism for the production of investigated enzymes during cultivation on brewer's spent grain.

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

**Thesis contains:** 42 pages  
17 figures  
2 tables  
45 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

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

**Defense date:** June 30, 2023

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Prije svega zahvaljujem svim profesorima na njihovom prenesenom znanju, iskustvu i mudrosti.

Zahvaljujem se cijeloj mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci tijekom studiranja, njihovi uvidi u načinu rješavanja prepreka, mudrost te znanje o situaciji su iznimno pomogli. Također zahvaljujem kolegama i prijateljima koji su bili uz mene u teškim situacijama.

Posebno zahvaljujem mentorici Marini Tišmi i asistentici Anđeli Zeko-Pivač za njihovo znanje, iskustvo, vrijeme i trud kod izrade diplomskog rada te prijatelju Milanu Juriću za njegovu nježnu, ali jaku ruku vodilju te njegovo znanje i nepresušnu mudrost.

Hvala Vam svima na kontinuiranoj potpori!

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>4</b>
2.1. FERMENTACIJA NA ČVRSTIM NOSAČIMA .....	5
2.1.1. Lignocelulozni materijali.....	7
2.1.2. <i>Trametes versicolor</i> .....	10
2.2. HIDROLITIČKI ENZIMI ZA RAZGRADNJU LIGNOCELULOZE .....	11
2.2.1. Celulaza .....	12
2.2.2. $\beta$ -glukozidaza.....	13
2.2.3. Ksilanaza.....	14
2.2.4. Invertaza.....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>16</b>
3.1. ZADATAK .....	17
3.2. MATERIJALI .....	17
3.2.1. Supstrat i mikroorganizam .....	17
3.2.2. Kemikalije .....	18
3.2.3. Priprema otopina .....	19
3.3. METODE.....	20
3.3.1. Fermentacija na čvrstim nosačima .....	20
3.3.2. Gubitak na masi supstrata i određivanje pH vrijednosti supstrata .....	21
3.3.3. Udio suhe tvari .....	22
3.3.4. Ekstrakcija enzima .....	22
3.3.5. Mjerenje aktivnosti enzima .....	23
3.3.6. Bradfordična metoda .....	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>27</b>
4.1. UZGOJ <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> NA PIVSKOM TROPU U UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA	28
4.2. PROIZVODNJA HIDROLITIČKIH ENZIMA UZGOJEM <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> NA PIVSKOM TROPU U	
UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA .....	29
4.2.1. Proizvodnja enzima celulaze uzgojem <i>Trametes versicolor</i> na pivskom tropu u	
uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.....	29
4.2.2. Proizvodnja enzima $\beta$ -glukozidaze uzgojem <i>Trametes versicolor</i> na pivskom tropu	
u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.....	30
4.2.3. Proizvodnja enzima ksilanaze uzgojem <i>Trametes versicolor</i> na pivskom tropu u	
uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.....	31
4.2.4. Proizvodnja enzima invertaze uzgojem <i>Trametes versicolor</i> na pivskom tropu u	
uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.....	32

5. ZAKLJUČCI .....	34
6. LITERATURA .....	37

## Popis oznaka, kratica i simbola

### OZNAKE:

$c$	množinska koncentracija tvari [mmol/L]
Da	unificirana jedinica mase atoma [ $1,6605 \cdot 10^{-27}$ kg]
$\gamma$	masena koncentracija tvari [g/L]
$M(Mr)$	molarna masa [g/mol]
rcf	relativna centrifugalna sila ( 1 rcf=1 $g$ , $g=9,81$ m/s <sup>2</sup> )
S.A.	specifična aktivnost enzima [U/mg]
V.A.	volumna aktivnost enzima [U/mL]
U	međunarodna jedinica enzimске aktivnosti [ $\mu$ mol/min]
dA/dt	promjena apsorbancije u vremenu [1/min]
$\lambda$	valna duljina [nm]



## **1. UVOD**

Pivski trop je nutritivno bogat nusproizvod koji se proizvodi u pivovarama diljem svijeta. Pivski trop je u osnovi lignocelulozni materijal, čiji su glavni sastojci hemiceluloza, celuloza i lignin te proteini. Recikliranje i iskorištavanje nusprodukata proizvodnje piva, kao što je pivski trop, važni su za smanjenje štetnog utjecaja na okoliš, potrošnje energije i troškova zbrinjavanja otpada. Trenutno se pivski trop najviše koristi kao stočna hrana, dok veliki dio završava kao otpad. Pivski trop je zbog svog bogatog kemijskog sastava pogodan supstrat za rast mikroorganizama i ispunjava neke od zahtjeva potrebnih za biotehnoški razvitak, uključujući redovitu dostupnost i nisku tržišnu cijenu. Uzgojem bakterija, gljiva i kvasaca na pivskom tropu proizvode se enzimi i metaboliti, mikrobna biomasa, lijekovi i razni materijali (Bianco i sur., 2020).

Fermentacija na čvrstim nosačima je proces koji se koristi za omogućavanje uvjeta rasta i razmnožavanja mikroorganizma na lignoceluloznim materijalima, u kontroliranim uvjetima. Temeljni princip ovakve vrste fermentacije je stimuliranje rasta mikroorganizma imitirajući uvjete u prirodi na vlažnim supstratima, regulirajući temperaturu, pH i vlagu. Najvažniji čimbenici koje treba uzeti u obzir tijekom razvoja ovog procesa su izbor mikroorganizama i izbor supstrata. Izbor najprikladnijih mikroorganizama koji će se uzgajati na ostacima poljoprivredne i agroindustrije uvelike ovisi o njihovom sastavu. U slučaju lignoceluloznih ostataka, gljive truleži drva su najzastupljenije (Soccol i sur., 2017).

*Trametes versicolor* pripada višim gljivama, naziva se još gljivom bijelog truljenja, a najčešće raste na poluraspadnutim deblima drveća i iza sebe ostavlja bijeli prah celuloze. Tijekom rasta u prirodi na drveću, *T. versicolor* uzrokuje razgradnju lignocelulozne strukture izlučivanjem različitih izvanstaničnih ligninolitičkih enzima (Tišma i sur., 2021a). Supstrat pivskog tropa pogodno je okruženje za razvoj gljiva, uključujući *T. versicolor*, te proizvodnju njihovih enzima i visokovrijednih produkata (Lynch i sur., 2016).

Cilj ovog rada bio je uzgojiti *T. versicolor* na hranjivoj podlozi lignoceluloznog materijala, pivskog tropa, u svrhu proizvodnje hidrolitičkih enzima (celulaze,  $\beta$ -glukozidaze, ksilanaze i invertaze), u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima.



## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. Fermentacija na čvrstim nosačima**

Fermentacija na čvrstim nosačima (engl. „*solid-state fermentation*“, SSF) je biotehnološki proces u kojemu se krute tvari koriste kao supstrati za rast mikroorganizama u odsutnosti ili minimalnoj prisutnosti slobodne vode. Čvrsti supstrat mora sadržavati dovoljno vode za rast i metabolizam mikroorganizama (Leite i sur., 2020). Za provedbu fermentacije potrebno je izabrati prikladan supstrat i mikroorganizam te optimizirati proces, primjerice početnu vlagu supstrata, pH supstrata, veličinu čestica supstrata, koncentraciju inokuluma, temperaturu inkubacije, itd. (Pandey, 2003).

Postupak provedbe SSF procesa uključuje sljedeće korake:

- priprema inokuluma,
- priprema supstrata,
- priprema posude (bioreaktora),
- izolacija i pročišćavanje produkata i
- zbrinjavanje otpada (Mitchell i sur., 2006).

Najvažniji čimbenici koje treba uzeti u obzir tijekom razvoja SSF procesa su izbor mikroorganizama i izbor supstrata. Mikroorganizmi koji su posebno pogodni za SSF su filamentozne gljive, budući da uzgoj gljiva u SSF uvjetima oponaša njihovo prirodno stanište. Hifalni način rasta daje veliku prednost filamentoznim gljivama u odnosu na jednostanične mikroorganizme, budući na taj način imaju sposobnost prodiranja u čvrste supstrate za iskorištavanje dostupnih hranjivih tvari i dobru toleranciju na odsutnost slobodne vode što ih čini konkurentima u prirodnoj mikroflori za biokonverziju čvrstih supstrata. Kvasci i neke vrste bakterija (npr. *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* i *Lactobacillus sp.*) također mogu rasti u okruženju s niskom aktivnošću vode na čvrstim supstratima (Soccol i sur., 2017; Obi, 2019).

Supstrati koji se koriste u SSF procesima su većini slučajeva kompozitni i heterogeni materijali iz poljoprivrede ili nusproizvodi agroindustrije. Sirovi supstrati zahtijevaju pripremu i prethodnu obradu kako bi bili prikladni za upotrebu u SSF procesu, što uključuje:

- rezanje, mljevenje, usitnjavanje ili granuliranje supstrata,
- kemijsku ili enzimsku hidrolizu supstrata za povećanje dostupnosti hranjivih tvari,
- dodatak hranjivih tvari i makro i mikroelemenata i
- pasterizacija ili sterilizacija za eliminaciju kontaminanata (Mitchell i sur., 2006; Obi, 2019).

Poljoprivredni ostaci koji se mogu koristiti kao supstrati za SSF uključuju materijale koji se sastoje od celuloze, hemiceluloze, lignina, škroba, pektina i drugih vlakana. Izbor najprikladnijih mikroorganizama koji će se uzgajati na ovim supstratima uvelike ovisi o njihovom sastavu. Poljoprivredni ostaci nisu samo čvrsta potpora za apsorpciju hranjivih tvari i rast biomase, već su i izvor ugljika i hranjivih tvari. Ponekad je potrebna prihrana kako bi se osigurale sve potrebne hranjive tvari za optimalan rast mikroorganizma. Makro i mikroelementi koji se dodaju u medij uključuju fosfor, sumpor, kalij, magnezij, kalcij, cink, mangan, bakar, željezo, kobalt i jod (Soccol i sur., 2017).

Provedba SSF procesa uključuje sterilizaciju bioreaktora, nakon čega se dodaje obrađeni supstrat i inokulum radnog mikroorganizma, pri sterilnim uvjetima. Neki od procesa uključuju miješanje, aeraciju, održavanje konstantne temperature i brzine dotoka zraka kako bi se kontrolirali ključni parametri fermentacije: vlažnost i temperatura čvrstih supstrata te rast mikroorganizma. Izolacija i pročišćavanje uključuju ekstrakciju produkta iz bioreaktora i pročišćavanje produkta (Mitchell i sur., 2006).

SSF se trenutno koristi u nizu primjena kao što su proizvodnja enzima ili antibiotika, bioaktivnih spojeva i organskih kiselina te novih trendova u proizvodnji biogoriva, kao što su bioetanol i biodizel, kao izvora alternativne energije (Lizardi-Jiménez i sur., 2017).

SSF nudi nekoliko prednosti u odnosu na klasične submerzne fermentacije, kao što su smanjena mogućnost inhibicije supstratom, mogućnost proizvodnje enzima velikih volumena, niska potrošnja energije, produžena postojanost proizvoda, odsutnost organskih otpadnih voda i niski troškovi proizvodnje. Štoviše, korištenje agro-industrijskog otpada lignocelulozne strukture čini ovaj proces isplativijim i ekološki prihvatljivijim. Jedan od glavnih izazova koje treba prevladati u provedbi i industrijalizaciji SSF procesa uključuje akumulaciju topline zbog

heterogene prirode supstrata i metaboličkih aktivnosti, smanjenje propusnosti kisika te odvajanje supstrata od mikrobne biomase. Nakon fermentacije, fermentirani materijal se podvrgava procesu ekstrakcije u kojemu je odabir odgovarajućeg otapala vrlo bitan za učinkovitu ekstrakciju proizvoda iz fermentiranog materijala. Pravilno rukovanje i gospodarenje otpadom također predstavljaju značajan izazov u ovom slučaju. Ako konačni proizvod nije sama fermentirana krutina, troškovi obrade otpada znatno povećavaju cijenu proizvoda. Može se reći da je iznimno bitan ekonomski aspekt s obzirom na isplativost svih potrebnih postupaka koje je neophodno poduzeti. Različite strategije gospodarenja otpadom, poput recikliranja otpadnog fermentiranog materijala kao stočne hrane ili proizvodnje bioplina, ključne su za održivost procesa (Kumar i sur., 2021).

### 2.1.1. Lignocelulozni materijali

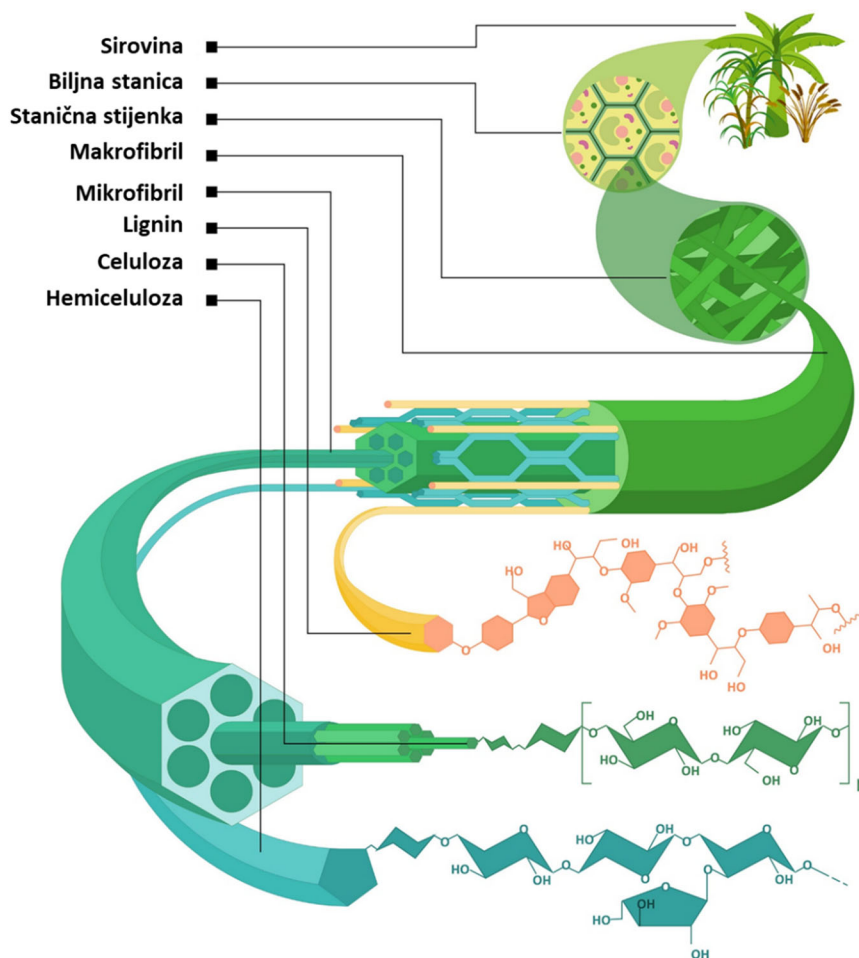
Procijenjeno je da se 181,5 milijardi tona lignoceluloznog materijala godišnje proizvodi na Zemlji. Samo se 8,2 milijarde trenutno koristi, od kojih 7 milijardi tona proizvodi poljoprivredna i šumarska industrija (Tišma i sur., 2021b).

Dostupna biomasa može se kategorizirati u: a) primarne izvore, proizvedene kao usjev ili konačan produkt (šećerna repa, mala postrojenja za oporabu energije u obliku plantacija biljaka), b) sekundarni izvori, ostatci nakon žetve ili berbe (zaostala suha vlakna šećerne trske, ovojnice riže te slama), c) tercijarni izvori, ostatci nastali tijekom i nakon završenog procesa (organska frakcija komunalnog čvrstog otpada, aktivni mulj od obrade otpadne vode, ostatci drva nakon obrade, itd.) (Kang i sur., 2014).

Lignocelulozni materijali, općenito, građeni su od celuloze (30 do 50%), hemiceluloze (20% do 35%) i lignina (15% do 25%). Udio navedenih komponenti može varirati među biljnim vrstama i biljnim tkivima, ovisno o dobi, stadiju rasta i drugim uvjetima (Biswas i sur., 2014, Mussatto i Teixeira, 2012).

**Slika 1** prikazuje glavne komponente koje tvore strukturu lignocelulozne biomase. Struktura hemiceluloze je polisaharid koji se sastoji od ksiloglukana, ksilana, manana, glukomanana i  $\beta$ -glukana (Scheller i Ulvskov, 2010). Celuloza je glavni gradivni element stanične stijenke bilo koje biljke, polisaharid koji se sastoji od D-glukočnih jedinica povezanih  $\beta$ -1,4 vezama (Mc Kendry, 2002), a odgovorna je za mehaničku čvrstoću i kemijsku stabilnost (Yu i sur., 2018).

Treća komponenta koja djeluje kao vezivo između celuloze i hemiceluloze naziva se lignin (Mehta i sur., 2020). Lignin je hidrofobni, aromatični polimer koji se sastoji od tri glavne fenolne komponente, a to su *p*-kumarilni alkohol, koniferilni alkohol i sinapilni alkohol (Menon i Rao, 2012).



**Slika 1** Struktura lignocelulozne biomase (Magalhães i sur., 2019)

Lignocelulozni materijali također sadrže visokovrijedne komponente kao što su šećeri, minerali i proteini. Odlaganje ovog otpada na tlo ili odlagališta uzrokuje ozbiljne ekološke probleme i nepotrebne gubitke visokovrijednih komponenti, stoga je razvoj procesa ponovne uporabe ovog otpada od velikog interesa. Budući da su ovi materijali bogati šećerima, koje mikroorganizmi lako asimiliraju, vrlo su prikladni za korištenje kao sirovine u proizvodnji industrijski važnih spojeva u procesima fermentacije. Osim što služe kao jeftina sirovina za proizvodnju važnih metabolita i lignocelulotičkih enzima, ponovna uporaba lignoceluloze u procesima fermentacije ekološki je prihvatljiva metoda gospodarenja otpadom (Mussatto i Teixeira, 2012).



### Pivski trop

U tijeku proizvodnje piva nastaje značajna količina različitih nusprodukata. U zavisnosti od količine najzastupljeniji sporedni proizvodi su pivski trop i pivski kvasac (Horvat, 2017). Tijekom procesa proizvodnje piva, škrobni endosperm slada podvrgnut je enzimskoj razgradnji, što rezultira oslobađanjem fermentabilnih (maltoza i maltotrioza) i nefermentabilnih (dekstrini) ugljikohidrata, topljivih proteina, polipeptida i aminokiselina. Dobiveni medij koji fermentira u pivo djelovanjem kvasca poznat je kao sladovina. Dio koji se odvaja naziva se pivski trop i čine ga netopljive komponente zrna koje se sastoje uglavnom od omotača (Lynch i sur., 2016).

Kemijski sastav pivskog tropa (**Tablica 1**) ovisi o vrsti ječma, vremenu žetve, uvjetima klijanja ječma te kvalitete i procesa ukomljavaanja sa surogatima koji se koriste u proizvodnji sladovine (Bianco i sur. 2020). Ovisno o tipu piva koji se proizvodi, pivski trop u svom sastavu može sadržavati ostatke ječmenog slada ili neslađenih sirovina, tzv. surogata (kukuruz, pšenica i sl.). Izrazito je bogat celulozom, hemicelulozom i ligninom zbog čega pripada skupini lignoceluloznih materijala, također sadržava proteine, masti, škrob i pepeo te vitamine (B1, B2, B6 i K) i minerale (fosfor, kalij, kalcij, željezo, cink i mangan) (Zeko-Pivač i sur., 2022).

**Tablica 1** Kemijski sastav pivskog tropa preuzet iz literature Bianco i sur. 2020 .

Komponenta	g/kg suhe tvari	Esencijalne i neesencijalne aminokiseline	% ukupnih proteina
Celuloza	3–330	Histidin	26,27
Hemiceluloza	192–419	Glutaminska kiselina	16,59
Ksilan	136–206	Asparaginska kiselina	4,81
Arabinan	56–419	Valin	4,61
Škrob	10–120	Arginin	4,51
Lignin	115–278	Serin	3,77
Lipidi	30–106	Tirozin	2,57
Proteini	142–310	Glicin	1,74
Pepeo	11–46	Asparagin	1,47
Topive tvari	58–107	Lizin	14,31
Ferulinska kiselina	1860–1948	Leucin	6,12
p-kumarinska kiselina	565–794	Fenilalanin	4,64
		Izoleucin	3,31

Pivski trop se najviše koristi kao stočna hrana i u proizvodnji etanola, također predstavlja vrijednu sirovinu i izvor spojeva koji također imaju potencijal kao funkcionalni, bioaktivni sastojci u ljudskoj prehrani. Sadržaj vode (70–80%) pivskog tropa te prisutnost proteina i šećera u njegovom sastavu čine ga pogodnim supstratom za uzgoj mikroorganizama u SSF procesu, s ciljem proizvodnje visokovrijednih proizvoda, poput enzima (Lynch i sur., 2016).

### 2.1.2. *Trametes versicolor*

*Trametes versicolor* (sin. *Coriolus versicolor* i *Polyporus versicolor*) pripada rodu *Basidiomycota* carstva gljiva, kolokvijalno nazvanih *basidiomicete*. Zbog svog oblika i višestrukih boja, koje podsjećaju na divlje purane, *T. versicolor* se još naziva i “puranov rep”. U istočnim kulturama poznat je kao Yun-Zhi (Kina) ili Kawaratake (Japan). U medicinskoj literaturi zastupljena je od 1973. godine, uglavnom pod imenom *Coriolus versicolor*, kao jedna od najproučavanijih ljekovitih gljiva. Koristi se u obliku ekstrakata ili kao biomasa. Najpoznatiji komercijalni pripravci *T. versicolor* su polisaharopeptid krestin (PSK) i polisaharopeptid (PSP). Imaju slične fiziološke aktivnosti, ali se razlikuju u strukturi. Oba su komercijalno dobivena iz micelija *T. versicolor* uzgojenog u submerznom uzgoju.

U prirodi *T. versicolor* obitava na raznim rodovima tvrdog drveća (hrast, prunus) i nekih četinjača (jela i bor), a bazidij se tijekom cijele godine uglavnom pojavljuje na panjevima i deblima. *T. versicolor* posjeduje sposobnost razgradnje lignina na drveću, uzrokuje “bijelu trulež”, odakle potječe naziv za vrstu filamentoznih gljiva. U laboratorijskim uvjetima, *T. versicolor* se može uzgajati koristeći submerzni uzgoj (SmF) ili uzgoj na čvrstim supstratima (SSF). Tijekom rasta u prirodi, *T. versicolor* razgrađuje lignocelulozu lučenjem složenog sustava različitih izvanstaničnih ligninolitičkih enzima. U SSF-u se *T. versicolor* može uzgajati na različitim čvrstim supstratima, a najčešći su lignocelulozni materijali. U mnogim slučajevima proizvod SSF-a je lignocelulozna biomasa biomodificirana od strane mikroorganizama, koja se dalje može primijeniti u proizvodnji biogoriva i/ili proizvodnji bioproizvoda kao što su enzimi, ili koristiti kao stočna hrana (Tišma i sur., 2021a).

Gljive bijelog truljenja su jedini organizmi koji mogu cjelovito razgraditi drvenasti materijal, najvećim dijelom zbog visoke proizvodnje lakaze (Singh Dhillon i sur., 2012), pri čemu *T. versicolor* pokazuje sklonost proizvodnje lakaze visoke aktivnosti, pri visokim koncentracijama dušika (Elisashvili i sur., 2008).

## **2.2. Hidrolitički enzimi za razgradnju lignoceluloze**

Struktura lignoceluloze je kompaktna s različitim vezama između celuloze, hemiceluloze i lignina što lignocelulozu čini vrlo složenim i izazovnim supstratom. Komponente su povezane vodikovom vezom, dok su između hemiceluloze i lignina kemijske veze koje se prvenstveno odnose na kemijske veze između ostataka galaktoze, arabinoze i ugljikohidrata. Nekoliko čimbenika odgovornih za kompleksnost lignoceluloznih materijala su sadržaj lignina koji štiti celulozu, celulozna isprepletenost hemicelulozom, visoka kristalnost i stupanj polimerizacije celuloze te niska dostupna površina celuloze s velikom čvrstoćom vlakana (Andlar i sur., 2018).

Celuloza sadrži najveći udio šećera u lignoceluloznim materijalima, a glukoza je za mnoge mikroorganizme preferirani izvor ugljika. Za učinkovitu hidrolizu celuloze potreban je niz enzima: a) egzo-1,4- $\beta$ -D-glukanaze ili celobiohidrolaze (EC 3.2.1.91), djeluju duž celuloznog lanca i cijepaju celobiozne jedinice s krajeva, b) endo-1,4- $\beta$ -D-glukanaze (EC 3.2.1.4), hidroliziraju unutarnje  $\beta$ -1,4-glukozidne veze nasumično u celuloznom lancu, c)  $\beta$ -glukozidaze (EC 3.2.1.21), hidroliziraju celobiozu u glukozu (Jørgensen i sur., 2007). Neki sustavi celulaze također sadrže egzo-1,4-beta-D-glukozidaze (EC 3.2.1.74) i celuloza 1,4- $\beta$ -celobiozidazu (EC 3.2.1.176) (Biswas i sur., 2014).

Za učinkovitu hidrolizu celuloze i hemiceluloze u lignoceluloznim materijalima celulaze djeluju sinergistički s hemicelulazama. Hemiceluloze su heterogeni sustavi s različitim bočnim skupinama, u odnosu na celulozu struktura je mnogo složenija. Sustav hemicelulaza za potpunu hidrolizu ksilana uključuje: a) endo-1,4- $\beta$ -D-ksilanaze (EC 3.2.1.8), koje hidroliziraju unutarnje veze u lancu ksilana, b) 1,4- $\beta$ -D-ksilozidaze (EC 3.2.1.37), hidroliziraju ksilooligosaharide s nereducirajućeg kraja i oslobađaju ksilozu, c) endo-1,4- $\beta$ -D-mananaze (EC 3.2.1.78), cijepaju unutarnje veze u mananu i 1,4- $\beta$ -D-manozidaze (EC 3.2.1.25), cijepaju manooligosaharide u manozu (Jørgensen i sur., 2007).

Prisutnost lignina, velika je prepreka za učinkovitu hidrolizu, zbog nemogućnosti prodiranja enzima (Jørgensen i sur., 2007). Razgradnju lignina uglavnom postižu lakaze (EC 1.10.3.2), mangan peroksidaze (EC 1.11. 1.13) i lignin peroksidaze (EC-1.11.1.14), glavne skupine ligninolitičkih enzima koje proizvode gljive bijele truleži (Andlar i sur., 2018).

Relativno visoka cijena ovih enzima ostaje glavna prepreka njihovoj komercijalnoj primjeni u industriji, stoga su istraživanja sve više usmjerena na poboljšanje učinkovitosti industrijski važnih enzima, identificiranje novih i aktivnijih enzima, razvijanje koktela enzima iz jeftino dostupnih supstrata i smanjenje troškova proizvodnje enzima (Biswas i sur., 2014). U **tablici 2** prikazane su tržišne cijene hidrolitičkih enzima proizvedenih iz različitih izvora, za 2018. godinu (Laca i sur., 2019).

**Tablica 2** Podatci o pakiranju, aktivnosti i cijeni hidrolitičkih enzima u eurima (Sigma-Aldrich, 2018).

Enzimi	Pakiranje	Aktivnost	Cijena(€) (Cijena po 1000 U)
Smjesa celulaza (Cellic CTec2)	50 mL	>1,3 g/mL ≥ 1000 U/g	100 (~1,7)
Celulaza iz <i>Trichoderma reesei</i>	50 mL	1,1-1,3 g/mg ≥700 U/g	112 (~2,8)
β-glukozidaza iz badema	/	≥2 U/mg	124(~50)
Endo-1,4-β-ksilanaze od <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100 g	≥1 U/mg	125(~1,3)
Rekombinantna ksilanaza, iz <i>Aspergillus oryzae</i>	10 g	≥2500 U/g	107(~4,3)

### 2.2.1. Celulaza

Celulaza je drugi naziv za endo-β-1,4-glukanazu (endo-β-1,4-D-glukan 4-glukanohidrolaza, EC 3.2.1.4). Aktivnost endoglukanaze zabilježena je u kulturama bazidiomiceta koje razgrađuju

lignocelulozni materijal poput lišća drveća, kora mandarina, opne jabuke te kore banane (Baldrian i Valaškova, 2008).

Enzimi celulaze su monomeri, s molekularnom masom između 22 i 45 kDa. Endoglukanaze proizvedene iz *Phanerochaete chrysosporium* sadrže veliku katalitičku domenu i aktivno mjesto vezanja celuloze od 4 kDa koja se može odvojiti cijepanjem, djelovanjem papaina, dok neke manje endoglukanaze nemaju aktivno mjesto vezanja celuloze (Baldrian i Valaškova, 2008). Endoglukanaze bazidiomiceta imaju optimalnu aktivnost između pH od 4,0 i 5,0, tj. blizu pH vrijednosti pronađenih u drvetu koloniziranim gljivama. Temperaturni optimumi za katalitičku reakciju su između 50 i 70 °C (Baldrian i Valaškova, 2008).

Celulaza proizvedena iz *T. versicolor* ima masu od 30 kDa i najveću aktivnost pri pH 5,0 (Baldrian i Valaškova, 2008).

Industrijsku primjenu nalazimo u proizvodnji bioetanola iz lignoceluloznog materijala, drugu generaciju biogoriva, kod koje glavnu prepreku predstavlja teško razgradivi lignin (Bajaj i Mahajan, 2019). Ovaj se enzim također koristi u brojnim industrijama kao što su prehrambena, industrija celuloze i papira, biotehnologija, tekstilna industrija, poljoprivreda, farmaceutska industrija i industrija stočne hrane (Singh i sur., 2021.).

### 2.2.2. $\beta$ -glukozidaza

Budući da je celobioza široko dostupan supstrat,  $\beta$ -glukozidazu proizvodi većina mikroorganizama.  $\beta$ -glukozidaze su izolirane iz nekoliko gljiva truleži drva, kako bijele tako i smeđe truleži, mikoriznih gljiva i biljnih patogena te bazidiomicetnim kvascima, iako neki kvasci ne koriste celobiozu kao supstrat (Baldrian i Valaškova, 2008).

Do sada izolirane  $\beta$ -glukozidaze pokazuju visoku strukturnu raznolikost, djelomično odražavajući unutarstaničnu/izvanstaničnu poziciju enzima. Detektirane molekularne mase kreću se od 35 do 640 kDa. Dok su mali enzimi s molekulskom masom oko 100 kDa monomeri i obično izvanstanični, izolirani su i homo-oligomerni enzimi.  $\beta$ -glukozidaze, također, mogu cijepati jedinice galaktoze, fukoze i disaharide laktoze.  $\beta$ -glukozidaze su tipično glikozilirane, ali sadržaj jedinica šećera varira (Baldrian i Valaškova, 2008). *T. versicolor* proizvodi  $\beta$ -glukozidazu od 300 kDa koja je monomerni glikoprotein s 90% glikozilacije (Baldrian i Valaškova, 2008).

Slično kao celulaze,  $\beta$ -glukozidaza se koristi u proizvodnji biogoriva, cijepanjem veza oslobađa glukozu koju mikroorganizmi koriste kao supstrat za daljnju preradu materijala (Bajaj i Mahajan, 2019).

### 2.2.3. Ksilanaza

Ksilanaza je drugi naziv za endo-1,4- $\beta$ -ksilanazu (1,4- $\beta$ -D-ksilanksilanohidrolaza, E.C.3.2.1.8). Za endo-ksilanaze se navodi da ih uglavnom proizvode mikroorganizmi, mnoge bakterije i gljive. Ksilanaze iz gljiva su aktivne u temperaturnom rasponu između 60 i 80°C i vrlo su stabilne. Ovi enzimi su obično glikoproteini i većina pokazuje najveću aktivnost pri kiselom pH, dok se raspon pH kreće od 3-8, ovisno o vrsti izvora iz kojega je proizvedena ksilanaza. Postoje u mnoštvu oblika, a većina pokazuje varijabilnu molekulsku masu u rasponu 6–38 kDa (Subramaniyan, Prema, 2002; Bajpai, 2014).

Ksilanaze se koriste u drugoj generaciji proizvodnje bioetanola, u kombinaciji sa celulazama, gdje se ksilan razgrađuje do ksiloze. Ostale primjene su u preradi stočne hrane, preradi hrane, proizvodnji papira i celuloze, uklanjanju finih vlakana iz tekstilnog materijala i farmaciji (Bajaj i Mahajan, 2019).

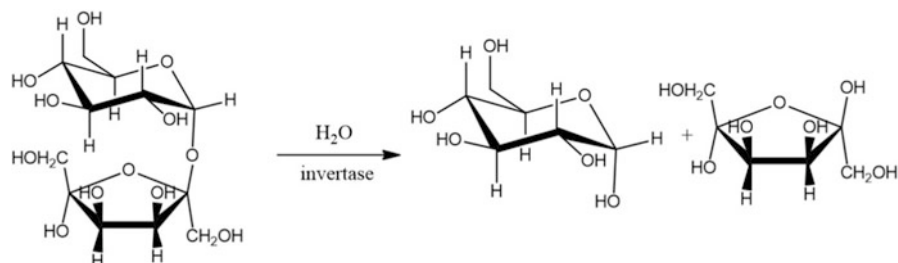
### 2.2.4. Invertaza

Službeno ime za invertazu je  $\beta$ -fruktozidaza (EC 3.2.1.26). Invertaza katalizira reakciju hidrolize terminalnih nereducirajućih krajeva  $\beta$ -fruktofuranozida (disaharidi, trisaharidi, fruktani, kao npr. inulin). Primarna primjena invertaze je hidroliza saharoze na ekvimolarnu smjesu glukoze i fruktoze (tzv. invertni šećer) uz široki pH optimum. Invertni šećer dobiven reakcijom s ovim enzimom je bezbojan te posjeduje veći prinos konverzije nego proizvod dobiven kiselom hidrolizom (Andjelković i sur, 2010).

Invertaza ili  $\beta$ -D-fruktozidaza hidrolizira saharozu i polisaharide, koji imaju isti tip  $\beta$ -D-fruktofuranozil veze, s ciljem dobivanja fruktoze i glukoze kao krajnjih produkata. Dobivena smjesa fruktoze i glukoze naziva se „invertni šećer“ (ekvimolarna smjesa), zbog inverzije optičkih svojstava kiralnih molekula od pozitivne prema negativnoj rotaciji. Najčešći oblik invertnog šećera je med. Invertaze također mogu sintetizirati fruktooligosaharide, gdje je saharoza prisutna u visokim koncentracijama. Hidroliza pomoću invertaze se odvija pri niskim

koncentracijama saharoze, oko 10%, a ukoliko je koncentracija veća, 20-80%, sintetizira kratke fruktooligosaharidne lance (Veana i sur., 2018).

Invertaza cijepa O-C fruktoznu vezu, odnosno  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze saharoze. Temperaturni optimum je od 25-35°C. Većina gljiva proizvodi invertazu izvanstanično (Veana i sur., 2018).



**Slika 2** Prikaz cijepanja  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze pomoću invertaze

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. Zadatak

Cilj ovog diplomskog rada bio je:

- a) provedba fermentacije na čvrstim nosačima koristeći sterilizirani pivski trop iz Osječke pivovare kao supstrat, pomoću gljive bijelog truljenja *T. versicolor* TV-6, tijekom 15 dana
- b) svakodnevno praćenje udjela suhe tvari, pH i gubitka na masi supstrata
- c) mjerenje aktivnosti enzima celulaze,  $\beta$ -glukozidaze, ksilanaze i invertaze

### 3.2. Materijali

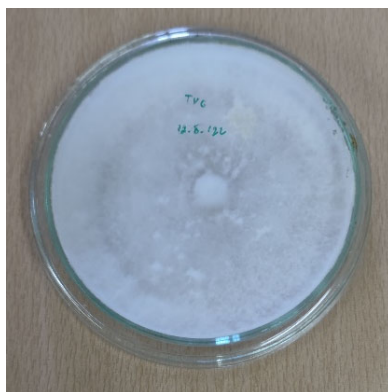
#### 3.2.1. Supstrat i mikroorganizam

U ovom radu kao supstrat korišten je pivski trop (Osječka pivovara, Osijek, Hrvatska) (**slika 3**). Pivski trop je osušen na 45 °C tijekom 48 h te je skladišten na 25 °C.



**Slika 3** Osušeni pivski trop (Osječka pivovara, Osijek, Hrvatska)

Korišten je soj mikroorganizma gljive bijelog truljenja *T. versicolor*, TV-6 (Ljubljana, Slovenija). Kultura je uzgajana na krumpirovom dekstroza agaru (Liofilchem S.r.l., Via Scozia, Roseto degli Abruzzi TE, Italija) (**slika 4**), 14 dana pri 27 °C u inkubatoru bez ventilacije (BINDER GmbH, Tuttlingen, Njemačka) (**slika 5**).



**Slika 4** Kultura *T. versicolor* uzgojena na krumpirovom dekstroza agaru, stara 14 dana



**Slika 5** Inkubator (BINDER GmbH, Tuttlingen, Njemačka)

#### 3.2.2. Kemikalije

Korištene su sljedeće kemikalije: krumpirov dekstroza agar (Liofilchem S.r.l., Via Scozia, Roseto degli Abruzzi TE, Italija), citratna kiselina monohidrat (Grammol, Zagreb, Hrvatska), natrijev hidroksid mini perle (Grammol, Zagreb, Hrvatska), 1 M natrijev hidroksid (Grammol, Zagreb, Hrvatska), ledena octena kiselina 99,5% (J.T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, SAD), natrij acetat bezvodni (T.T.T., Zagreb, Hrvatska), *p*-4-nitrofenil  $\beta$ -D-glukopiranoza, 99% (Acros Organics, Geel, Belgija), natrijev karbonat bezvodni (T.T.T., Zagreb, Hrvatska), ksilan od bukovine, 90% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), saharoza 99% (Acros Organics, Geel, Belgija), 3,5-dinitrosalicilna kiselina, 98% (Acros Organics, Geel, Belgija), Na-K-tartarat tetrahidrat (Fischer Scientific, Hampton, New Hampshire, SAD).

### **3.2.3. Priprema otopina**

#### **Priprema krumpirovog dekstroza agara**

U 250 mL destilirane vode suspendirano je 10,5 g krumpirovog dekstroza agara i sterilizirano u autoklavu (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd) na 121 °C, 15 min. Djelomično ohlađena otopina krumpirovog dekstroza agara prenesena je u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice i korištena za kultivaciju *T. versicolor* pri sterilnim uvjetima.

#### **1 M citratni pufer**

U 750 mL destilirane vode dodano je 200 g monohidrata citratne kiseline. Uz miješanje, postupno su dodane NaOH mini perle do korekcije pH na 4,3. Tikvica je nadopunjena vodom do oznake 1 L te je pH korigiran na 4,5.

#### **0,05 M citratni pufer**

0,05 M citratni pufer pripremljen je razrjeđivanjem otopine 1 M citratnog pufera te je korekcija pH provedena s 1 M NaOH na 4,8 i 5,3.

#### **0,1 M acetatni pufer**

0,1 M acetatni pufer pripremljen je iz dvije otopine:

- Otopina A se sastoji od 2,3 mL ledene octene kiseline otopljene u 200 mL destilirane vode.
- Otopina B se sastoji od 10,88 g natrij-acetata ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) otopljenog u 400 mL destilirane vode.

U 500 mL destilirane vode dodano je 148 mL otopine A i 352 mL otopine B te je pH iznosio 5,1.

#### **0,02 M *p*-4-nitrofenil β-D-glukopiranoza**

0,6025 g *p*-4-nitrofenil β-D-glukopiranoze otopljeno je u 100 mL 0,1 M acetatnog pufera (pH 5,1).

#### **0,2 M natrijev karbonat**

10,60 g natrijevog karbonata otopljeno je u 500 mL destilirane vode.

#### 1 % arabinoksilan

0,3 g arabinoksilana otopljeno je u 30 mL 0,05 M citratnog pufera (pH 5,3) uz miješanje i zagrijavanje na 70 °C.

#### 0,2 M saharoza

2 g saharoze otopljeno je u 20 mL 0,1 M acetatnog pufera (pH 4,5).

#### DNS reagens

10,9 g 3,5-dinitrosalicilne kiseline otopljeno je u 400 mL 50%-tne otopine NaOH uz zagrijavanje i miješanje na 70 °C. Dodano je 150 g Na-K-tartarat tetrahidrata, ohlađeno i nadopunjeno destiliranom vodom do oznake u odmjernoj tikvici volumena 500 mL.

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Fermentacija na čvrstim nosačima

Metoda provedbe fermentacije na čvrstim nosačima modificirana je prema metodi Bucić-Kojić i sur. (2020). U laboratorijske staklenke volumena 720 mL odvagano je 30 g osušenog pivskog tropa i dodano je 50 mL destilirane vode. Sadržaj u laboratorijskoj staklenci je dobro promiješan i steriliziran u autoklavu na 121 °C, 15 min (**slika 6**).



**Slika 6** Autoklav (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd)

Nakon sterilizacije, laboratorijske teglice su ohlađene na sobnu temperaturu te je supstrat inokuliran s micelijskim diskovima *T. versicolor* kultivirane na PDA agaru. U 10 mL sterilne destilirane vode suspendirano je 5 micelijskih diskova *T. versicolor*, promjera 1 cm i preneseno

u svaku laboratorijsku teglicu pri sterilnim uvjetima. Fermentacija je provedena u inkubatoru, bez ventilacije, na 27 °C u trajanju od 15 dana (**slika 7**).



**Slika 7** Uzgoj *T. versicolor* na pivskom tropu u laboratorijskim staklenkama

#### 3.3.2. Gubitak na masi supstrata i određivanje pH vrijednosti supstrata

Za određivanje pH vrijednosti supstrata nakon svakog dana fermentacije, odvagano je 2 g fermentiranog supstrata i pomiješano s 10 mL destilirane vode, ekstrakcija je provedena na vorteksu (Vortex MX-S, DLAB Scientific, Kina) (**slika 8**) u intervalima od 5 min, tijekom 30 min. pH vrijednost mjerena je pH metrom (MA 5740, Iskra, Slovenija) (**slika 9**). Gubitak na masi supstrata praćen je vaganjem laboratorijske staklenke nakon svakog dana fermentacije.



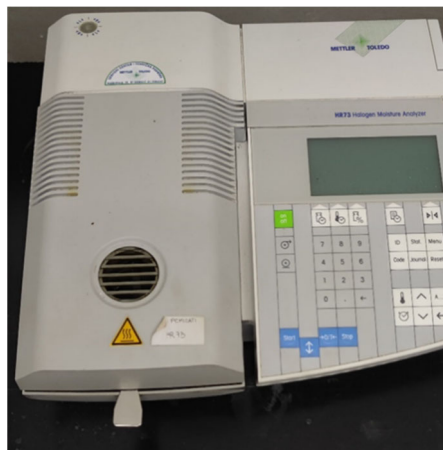
**Slika 8** Vorteks (Vortex MX-S, DLAB Scientific, Kina)



Slika 9 pH metar (MA 5740, Iskra, Slovenija)

#### 3.3.3. Udio suhe tvari

Udio suhe tvari određen je termo gravimetrijskom metodom na analizatoru vlage za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo) (slika 10). Na aluminijski podložak odvagano je 1 g uzorka te je sušenje provedeno na 105 °C s kriterijem završetka procesa (engl. switch off 3: gubitak mase od 1 mg u 50 s). Sušenje je provedeno do konstantne mase, udio suhe tvari je određen u netretiranom i fermentiranom supstratu, nakon svakog dana fermentacije.



Slika 10 Analizator vlage (HR-73, Mettler Toledo)

#### 3.3.4. Ekstrakcija enzima

Nakon svakog dana fermentacije odvagano je 2 g fermentiranog uzorka i pomiješano s 10 mL odgovarajućeg pufera za mjerenje aktivnosti enzima. Za mjerenje aktivnosti ksilanaze fermentirani supstrat je pomiješan s 0,05 M citratnim puferom (pH 5,3), za invertazu s 0,1 M acetatnim puferom (pH 4,5), za  $\beta$ -glukozidazu 0,1 M acetatnim puferom (pH 5,1) i celulazu s 0,05 M citratnim puferom (pH 4,8). Ekstrakcija je provedena miješanjem na vorteksu u trajanju

od 30 min, s intervalima od 5 min. Nakon toga uzorci su centrifugirani (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka) (**slika 11**) na 10000 rcf, 5 min. Supernatanti su dalje korišteni za mjerenje aktivnosti hidrolitičkih enzima.



**Slika 11** Centrifuga (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)

#### 3.3.5. Mjerenje aktivnosti enzima

Aktivnosti hidrolitičkih enzima mjerene su spektrofotometrijski (UV-1280 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japan) (**slika 12**) pri određenim valnim duljinama, sukladno testu za mjerenje pojedinog enzima. Volumne i specifične aktivnosti enzima su izračunate prema **formulama (1) i (2)**:

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

gdje su:

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

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

f<sub>razrjeđenja</sub> – faktor razrjeđenja

V<sub>reakcije</sub> – ukupan volumen reakcijske smjese u kivetu [mL]

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

V<sub>E</sub> – volumen kivete [mL]

$d$  – promjer kivete [cm]

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

gdje su:

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

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

$\gamma_{enzim}$  – masena koncentracija enzima [mg/mL]



**Slika 12** Spektrofotometar (UV-1280 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japan)

#### **Mjerenje aktivnosti celulaze**

Aktivnost celulaze mjerena je prema modificiranoj metodi Adney i Baker (1996), spektrofotometrijski na valnoj duljini  $\lambda = 540$  nm. Budući da je celulaza enzim koji katalizira razgradnju celuloze na jednostavnije šećere, korištena je baždarna krivulja za određivanje koncentracije glukoze. Kao supstrat korišten je filter papir Whatman br. 1 od 50 mg (1,0 x 6,0 cm). U staklenu epruvetu dodan je filter papir, 1 mL 50 mM Na-citratni pufer (pH 4,8) i 0,5 mL ekstrakta celulaze, sadržaj je promiješan i inkubiran u vodenoj kupelji 60 min na 50 °C. Nakon inkubacije dodano je 3 mL DNS reagensa, promiješano i inkubirano 5 min u vodenoj kupelji na 100 °C. DNS reagens korišten je u svrhu detekcije reducirajućih šećera poput glukoze. Nakon



hlađenja 0,2 mL smjese je razrjeđeno s 2,5 mL destilirane vode te je mjerena apsorbancija. Kako bi se izuzeo utjecaj reagensa potrebno je pripremiti slijepu probu bez dodatka filter papira i ekstrakta enzima celulaze. Također, mjerena je slijepa proba enzima pri čemu se ne dodaje filter papir, kao i slijepa proba supstrata (filter papir) pri čemu se ne dodaje enzim. Aktivnost enzima celulaze izražava se kao FPU (*eng. „filter paper units“*), odnosno količina enzima koja oslobodi 2 mg reducirajućih šećera iz 50 mg filter papira u 1 h, prema **formuli (3)**:

$$FPU = \frac{0,37}{(\text{enzim})\text{ koji oslobađa } 2,0 \text{ mg glukoze}} \left[ \frac{\text{jedinica}}{\text{mL}} \right] \quad (3)$$

Brojnik 0,37 izračunava se prevođenjem 2,0 mg glukoze u ekvivalentan broj molova, iz volumena enzima koji se koristi i vremena inkubacije.

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

Aktivnost  $\beta$ -glukozidaze mjerena je prema modificiranoj metodi Karpe i sur. (2016), spektrofotometrijski na valnoj duljini  $\lambda = 400$  nm. Kao supstrat korišten je 0,02 M *p*-4-nitrofenil  $\beta$ -D-glukopiranoza, te je korištena baždarna krivulja za određivanje koncentracije *p*-nitrofenola. U staklenoj epruveti pomiješano je 0,5 mL otopine supstrata, 0,25 mL 0,1 M Na-acetatnog pufera (pH 5,1) i 0,25 mL ekstrakta enzima  $\beta$ -glukozidaze, promiješano i inkubirano u vodenoj kupelji 5 min na 50 °C. Nakon inkubacije u epruvetu je dodan 1 mL natrijevog karbonata u svrhu detekcije *p*-nitrofenola. Slijepa proba nije uključivala dodatak ekstrakta enzima  $\beta$ -glukozidaze.

#### Mjerenje aktivnosti ksilanaze

Aktivnost ksilanaze mjerena je prema modificiranoj metodi Bailey i sur. (1992), spektrofotometrijski na valnoj duljini  $\lambda = 540$  nm. Kao supstrat korišten je 1 % arabinoksilan, ksilanaza djeluje na supstrat ksilan razgrađujući ga do ksiloze. U staklenu epruvetu dodano je 0,9 mL otopine supstrata i 0,1 mL ekstrakta enzima ksilanaze. Inkubacija je provedena na 50 °C tijekom 5 min u vodenoj kupelji. Nakon inkubacije dodano je 1,5 mL DNS reagensa, te je sadržaj inkubiran 5 min na 100 °C u vodenoj kupelji. Slijepa proba sadržavala je 0,9 mL otopine supstrata, 0,1 mL 0,05 M citratnog pufera (pH 5,3) i 1,5 mL DNS reagensa. Slijepa proba enzima

sadržavala je 0,9 mL otopine supstrata, pri čemu je 0,1 mL ekstrakta enzima ksilanaze dodano nakon dodatka 1,5 mL DNS reagensa.

#### **Mjerenje aktivnosti invertaze**

Aktivnost invertaze mjerena je prema modificiranoj metodi Margetić i Vujčić (2017), spektrofotometrijski na valnoj duljini  $\lambda = 540$  nm. Kao supstrat korištena je 0,3 M otopina saharoze. Enzim saharoza katalizira hidrolizu šećera saharoze na jednostavnije šećere glukozu i fruktozu, stoga je za izračun aktivnosti enzima korištena baždarna krivulja za određivanje koncentracije smjese glukoze i fruktoze jednakih molarnosti. U staklenu epruvetu dodano je 0,4 mL otopine supstrata saharoze i 0,1 mL ekstrakta enzima invertaze. Inkubacija je provedena na 50 °C tijekom 5 min u vodenoj kupelji. Nakon inkubacije dodano je 0,5 mL DNS reagensa, te je sadržaj inkubiran 5 min na 100 °C u vodenoj kupelji. Slijepa proba sadržavala je 0,4 mL otopine supstrata, 0,1 mL 0,1 M acetatnog pufera (pH 4,5) i 0,5 mL DNS reagensa. Slijepa proba enzima sadržavala je 0,4 mL otopine supstrata, pri čemu je 0,1 mL ekstrakta enzima invertaze dodano nakon dodatka 0,5 mL DNS reagensa. Nakon inkubacije s DNS reagensom, smjesa se razrjeđuje s 4 mL destilirane vode.

#### **3.3.6. Bradfordična metoda**

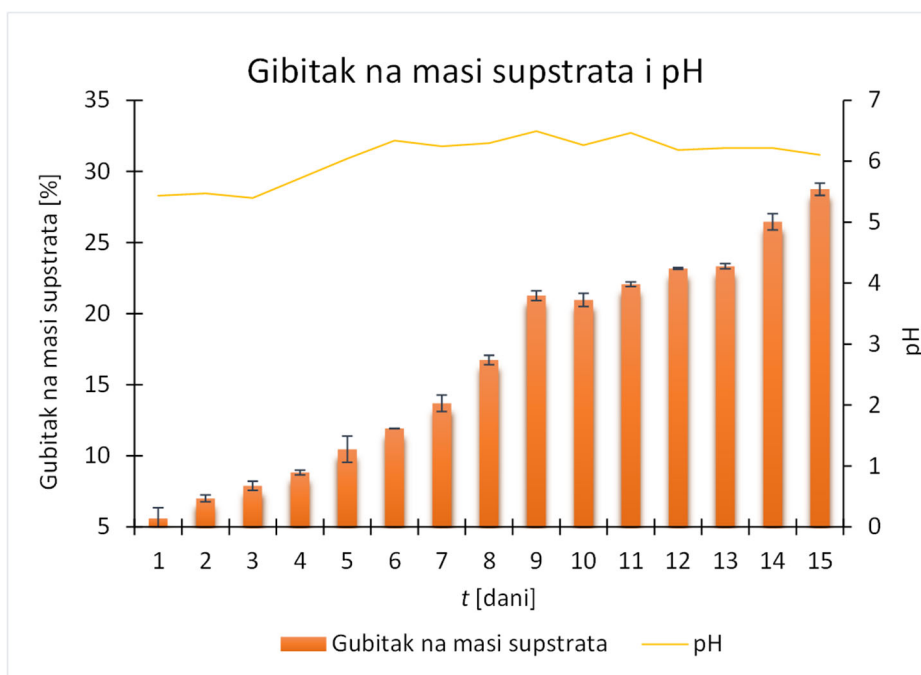
Bradfordična metoda se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje „Coomassie Brilliant Blue G-250“ za bazične i aromatske bočne ogranke proteina. Kationski oblik bojila ima  $\lambda$  maksimum od 470 nm, a anionski oblik koji se veže za proteine ima  $\lambda$  maksimum od 595 nm te se na toj valnoj duljini mjeri apsorbancija za protein (Kruger, 2009).

U kivetu je dodano 100  $\mu$ L ekstrakta enzima i 2 mL svježe pripremljenog Bradfordičinog reagensa te je reakcijska smjesa ostavljena stajati na sobnoj temperaturi 5 minuta. Po isteku vremena inkubacije očitana je apsorbancija pri valnoj duljini 595 nm.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Uzgoj *Trametes versicolor* na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Uzgoj *T. versicolor* proveden je u laboratorijskim staklenkama koristeći pivski trop kao supstrat, u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Fermentacija je provedena u trajanju od 15 dana. Vlažnost supstrata tijekom fermentacije kretala se u rasponu od 65,57% do 69,42%, što je optimalan raspon vlažnosti potreban za rast *T. versicolor*. Korekcija vlage u SSF procesu je izuzetno važna jer čvrsti supstrat mora imati odgovarajuću dostupnu vlagu kako bi omogućio rast i metabolizam mikroba. Previsok sadržaj vode rezultirao bi zbijanjem krutine, što bi dovelo do mogućnosti onečišćenja i spriječilo prijenos kisika. S druge strane, nizak sadržaj vode ograničava transport hranjivih tvari i proizvodnju enzima (He i sur., 2011). Gubitak ukupne mase supstrata nakon 15 dana fermentacije iznosio je 28,74%. Gubitak mase supstrata, odnosno razgradnja, povezana je s kompleksom enzima koji razgrađuju matricu supstrata, a proizvode ih mikroorganizmi tijekom SSF procesa (Larios-Cruz i sur., 2019.). Vrijednosti pH supstrata kretale su se u rasponu od 5,40 do 6,47. Rezultati gubitka mase supstrata i pH vrijednosti tijekom 15 dana fermentacije prikazani su na **slici 13**.



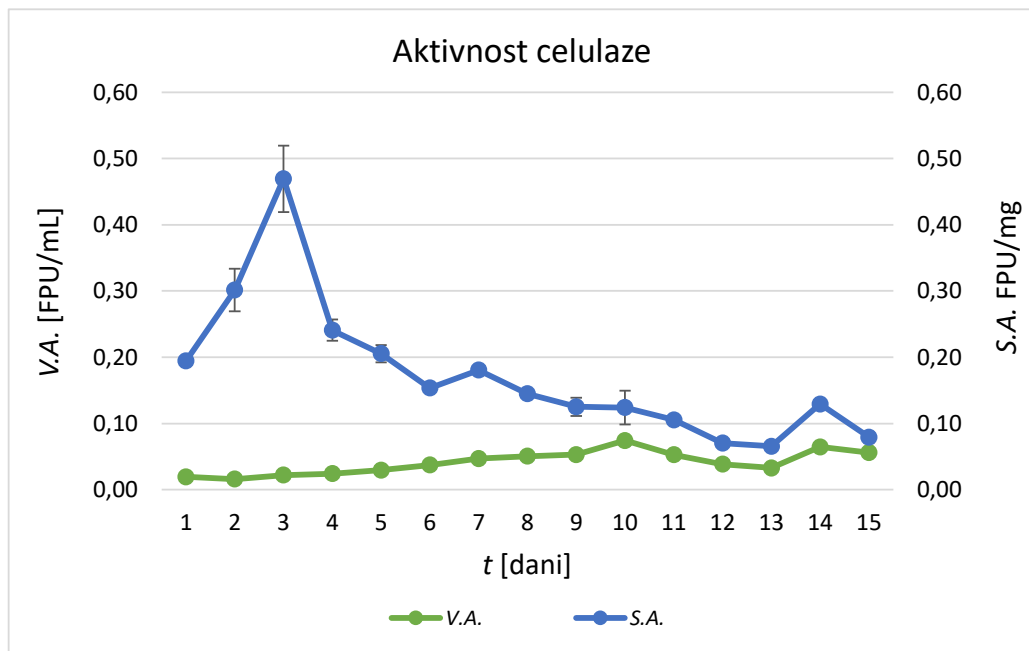
**Slika 13** Gubitak na masi supstrata i pH vrijednost supstrata tijekom 15 dana uzgoja *T. versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

(Početni procesni uvjeti:  $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $m$  (supstrata) = 30 g, udio vlage supstrata = 69,19%)

## 4.2. Proizvodnja hidrolitičkih enzima uzgojem *Trametes versicolor* na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

### 4.2.1 Proizvodnja enzima celulaze uzgojem *Trametes versicolor* na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Proizvodnja enzima celulaze iz gljive bijelog truljenja *T. versicolor* TV-6 provedena je u laboratorijskim staklenkama koristeći pivski trop kao supstrat. Eksperiment je proveden u inkubatoru bez ventilacije na 27 °C, u trajanju od 15 dana. Rezultati su prikazani na **slici 14**, gdje je vidljivo da su najveće volumne aktivnosti celulaze postignute nakon 10. dana fermentacije ( $0,074 \pm 0,007$  FPU/mL), dok je najveća specifična aktivnost postignuta nakon 3. dana fermentacije i iznosila je  $0,469 \pm 0,050$  FPU/mg.



**Slika 14** Aktivnost enzima celulaze tijekom 15 dana fermentacije

(Početni procesni uvjeti:  $T = 27$  °C,  $m$  (supstrata) = 30 g, udio vlage supstrata = 69,19%)

Rezultati su uspoređeni s literaturom. Liguori i sur. (2021) su pokazali da je *Aspergillus niger* LPB-334 bio najbolji proizvođač celulaze (od 32 ispitana mikroorganizma) tijekom uzgoja na pivskom tropu porijeklom iz craft pivovare Manebo (Striano, Napulj, Italija) u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima, pri čemu je postignuta specifična aktivnost od  $0,118 \pm 0,008$  U/mg na SSF. Nadalje, ovaj mikroorganizam je u pogledu proizvodnje celulaze bio najuspješniji

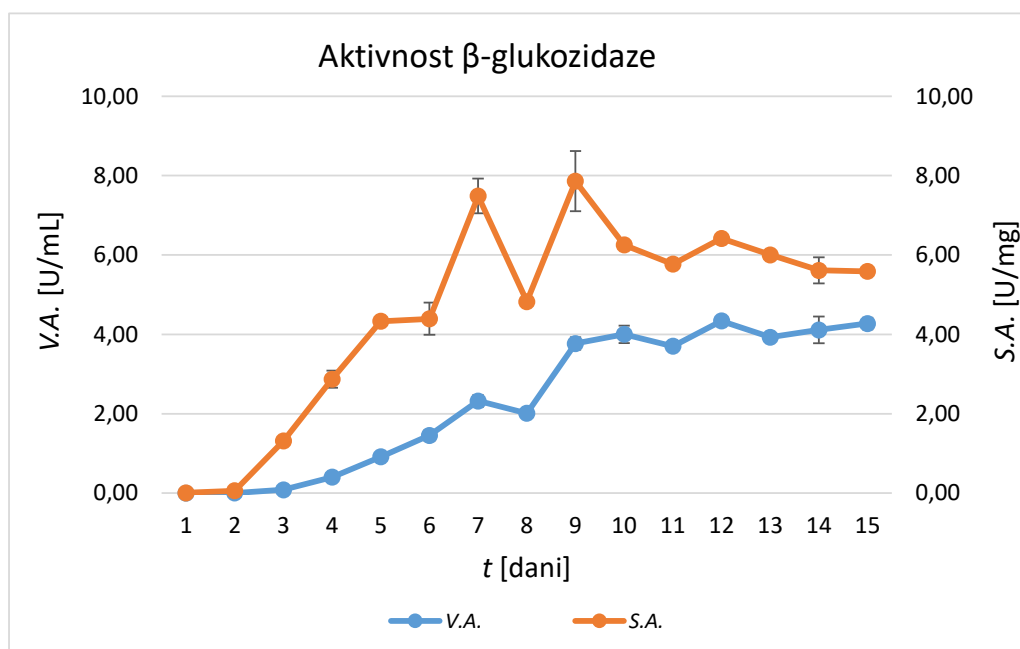
od 12 ispitanih mikroorganizama i prilikom submerznog uzgoja, pri čemu je postignuta volumna aktivnost od  $0,27 \pm 0,04$  U/mL.

Ilze i sur. (2013) su pokazali da nespecificirani soj *T. versicolor* tijekom rasta u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pšeničnim mekinjama proizvodi enzime celulaze čija je najveća volumna aktivnost od  $0,10 \pm 0,00$  U/mL postignuta nakon sedam dana fermentacije.

Machado i sur. (2020) su uzgajali *T. versicolor* na mikrokristalnoj celulozi (Avicel) pri čemu je postignuta specifična aktivnost celulaze od  $0,13$  FPU/mg proteina nakon 12 dana fermentacije.

#### 4.2.2. Proizvodnja enzima $\beta$ -glukozidaze uzgojem *Trametes versicolor* na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Proizvodnja enzima  $\beta$ -glukozidaze iz gljive bijelog truljenja *T. versicolor* TV-6 provedena je u laboratorijskim staklenkama koristeći pivski trop kao supstrat. Eksperiment je proveden u inkubatoru bez ventilacije na  $27$  °C, u trajanju od 15 dana. Rezultati volumne i specifične aktivnosti enzima  $\beta$ -glukozidaze prikazani su na **slici 15**. Najveća V.A.  $\beta$ -glukozidaze ostvarena je 12. dan ( $4,339 \pm 0,084$ U/mL), dok je najveća S.A. ostvarena nakon 9. dana fermentacije ( $7,864 \pm 0,759$  U/mg).



**Slika 15** Aktivnost enzima  $\beta$ -glukozidaze tijekom 15 dana fermentacije

(Početni procesni uvjeti:  $T = 27$  °C,  $m$  (supstrata) = 30 g, udio vlage supstrata = 69,19%)

Bernal-Uriz i sur. (2022) pokazali su da je tretiranjem pivskog tropa (Tocancipá, Kolumbija) s *Penicillium* HC1 u SSF uvjetima ostvarena najveća volumna aktivnost enzima  $\beta$ -glukozidaze nakon 12 dana fermentacije te je iznosila  $4,491 \pm 0,169$  U/mL.

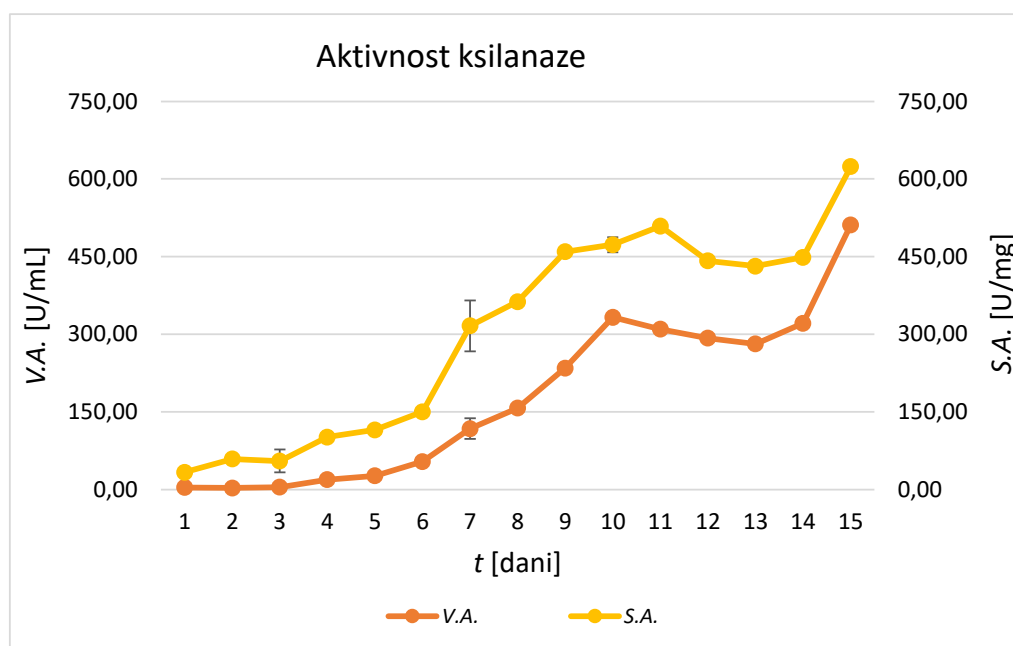
Pershad i Bisaria (2014) istražili su da je *Streptomyces* sp. proizveo  $\beta$ -glukozidazu volumne aktivnosti od 137 U/mL, na supstratu karboksimetil celulozi, dok je *Trichoderma harzianum* P49P11 proizvela  $\beta$ -glukozidazu volumne aktivnosti od 17,32 U/mL, na bagasi od šećerne trske.

Lekounougou i sur. (2009) pokazali su da je najveća aktivnost  $\beta$ -glukozidaze iz *T. versicolor* ostvarena 10. dana SSF-a (500 U) koristeći drvo breze kao supstrat te je također dokazano da termički tretirani supstrat breze nije pogodovao proizvodnji enzima, što može ukazati na bolju proizvodnju enzima na netretiranim lignoceluloznim materijalima, u ovom slučaju.

Machado i sur. (2020) su koristili mikrokristalnu celulozu (Avicel) kao supstrat u SSF uvjetima pomoću *T. versicolor* te je ostvarena specifična aktivnost  $\beta$ -glukozidaze od 20,0 U/mg nakon 12 dana fermentacije.

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

Proizvodnja enzima ksilanaze iz gljive bijelog truljenja *T. versicolor* TV-6 provedena je u laboratorijskim teglicama koristeći pivski trop kao supstrat. Eksperiment je proveden u inkubatoru bez ventilacije na 27 °C, u trajanju od 15 dana. Aktivnosti enzima ksilanaze prikazane su na **slici 16**, iz grafa je vidljivo da su najveća volumna i specifična aktivnost ksilanaze ostvarene nakon 15 dana fermentacije, a iznosile su  $511,187 \pm 4,694$  U/mL i  $624,039 \pm 0,754$  U/mg.



**Slika 16** Aktivnost enzima ksilanaze tijekom 15 dana fermentacije

(Početni procesni uvjeti:  $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $m$  (supstrata) = 30 g, udio vlage supstrata = 69,19%)

Liguori i sur. (2021) pokazali su da je najbolji proizvođač ksilanaze *A. niger* LPB-334, od 32 ispitana mikroorganizama uzgojena na pivskom tropu u uvjetima SSF-a, s najvećim zabilježenim vrijednostima S.A. od  $1,315 \pm 0,038$  U/mg, dok je submerznim uzgojem ovog mikroorgaizma ostvarena V.A od  $19,18 \pm 6,2$  U/mL, od 12 ispitanih mikroorganizama.

Irbe i sur. (2014) su istražili SSF uzgoj nespecificiranog soja *T. versicolor* na pšeničnim mekinjama kao supstratu, što je rezultiralo proizvodnjom ksilanaze čija je najveća V.A. iznosila  $4,0 \pm 0,52$  U/mL nakon 14. dana fermentacije. Također, uzgojem *Penicillium* HC1 na pivskom tropu (Tocancipá, Kolumbija) ostvarena je volumna aktivnost ksilanaze od  $16,233 \pm 1,87$  U/mL nakon 12 dana fermentacije (Bernal-Uriz i sur., 2022).

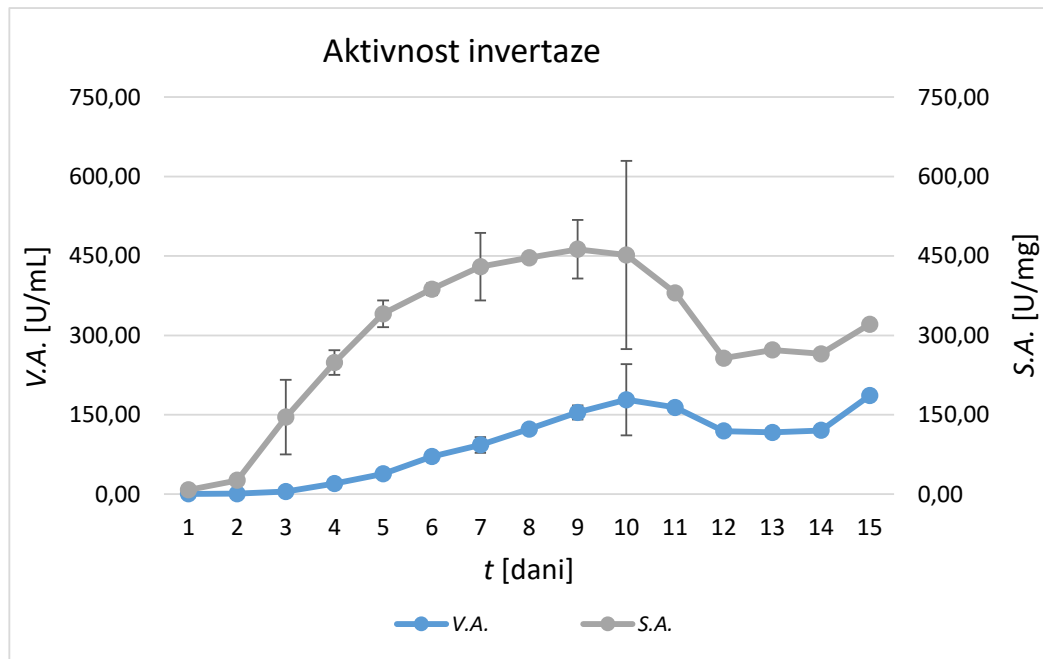
Machado i sur. (2020) su uzgajali *T. versicolor* na mikrokristalnoj celulozi (Avicel) pri čemu je ostvarena najveća S.A. endo-ksilanaze od 894 U/mg i  $\beta$ -ksilanaze od 9,6 U/mg, nakon 12 dana fermentacije.

#### 4.2.4. Proizvodnja enzima invertaze uzgojem *Trametes versicolor* na pivskom tropu u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Proizvodnja enzima invertaze iz gljive bijelog truljenja *T. versicolor* TV-6 provedena je u laboratorijskim staklenkama koristeći pivski trop kao supstrat. Eksperiment je proveden u



inkubatoru bez ventilacije na 27 °C, u trajanju od 15 dana. Rezultati aktivnosti enzima invertaze prikazane su na **slici 17**. Najveća V.A. ostvarena je 15. dan fermentacije, te je iznosila za  $186,251 \pm 4,812$  U/mL i S.A.  $462,647 \pm 55,160$  U/mg, nakon 9. dana fermentacije.



**Slika 17** Aktivnost enzima invertaze tijekom 15 dana fermentacije

(Početni procesni uvjeti:  $T = 27$  °C,  $m$  (supstrata) = 30 g, udio vlage supstrata = 69,19%)

Prema literaturi, *Aspergillus oryzae* FS4 je dobar samostalni proizvođač invertaze s najvećom S.A. od 1858,2 U/mg (Veana i sur., 2018), te soj bakterije *Bacillus subtilis* s volumnom aktivnosti invertaze od 0,39 U/mL, na bagasi od različitog lignoceluloznog materijala (Reddy i Krishnam, 2010).

## **5. ZAKLJUČCI**

Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka u radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- ✓ Dokazana je mogućnost proizvodnje celulaze,  $\beta$ -glukozidaze, ksilanaze i invertaze uzgojem *T. versicolor* TV-6 na pivskom tropu.
- ✓ Aktivnosti ksilanaze i invertaze su visoke: maksimalne aktivnosti su  $511,187 \pm 4,694$  U/mL i  $624,039 \pm 0,754$  U/mg za ksilanazu te  $186,251 \pm 4,812$  U/mL i  $462,647 \pm 55,160$  U/mg za invertazu.
- ✓ *T. versicolor* TV-6 uzgojen na pivskom tropu proizvodi celulazu i  $\beta$ -glukozidazu nižih aktivnosti –  $0,074 \pm 0,007$  FPU/mL te  $0,469 \pm 0,050$  FPU/mg za celulazu i  $4,339 \pm 0,084$  U/mL te  $7,864 \pm 0,759$  U/mg za  $\beta$ -glukozidazu
- ✓ Tijekom rasta *T. versicolor* TV-6 na pivskom tropu pH supstrata mijenjao se tijekom fermentacije od pH = 5,44 do pH 6,50.



## **6. LITERATURA**

- 
- Adney B, Baker J: Measurement of Cellulase Activities. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, 2008.
- Andlar M, Rezić T, Marđetko N, Kracher D, Ludwig, R, Šantek B: Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences* 18(11):768–778, 2018.
- Bajaj P, Mahajan R: Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:8711–8724, 2019.
- Bajpai, P. (2014). Sources, production, and classification of xylanases. U *Xylanolytic enzymes*, str. 43-52. Academic press, UK, Oxford, 2014.
- Baldrian P, Valaškova V: Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *Federation of European Microbiological Societies*, 32:501-521, 2008.
- Bernal-Ruiz M, Correa-Lozano A, Gomez- Sánchez L, Quevedo-Hidalgo B, Rojas-Pérez LC, García-Castillo C, Gutiérrez-Rojas I, Narváez-Rincón PC: Brewer's spent grain as substrate for enzyme and reducing sugar production using *Penicillium sp.* HC1. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* 45(176):850-863, 2022.
- Bianco A, Budroni M, Zara S, Mannazzu I, Fancello F, Zara G: The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104:8661–8678, 2020.
- Biswas R, Bisaria SV, Persad A: Production of cellulolytic enzymes. U *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*, str. 105-131., John Wiley & Sons, Inc., SAD, New York, First Edition:105-131, 2014.
- Bucić-Kojić A, Fernandes F, Silva T, Planinić M, Tišma M, Šelo G, Šibalić D, Pereira DM, Andrade PB: Enhancement of the anti-inflammatory properties of grape pomace treated by *Trametes versicolor*. *Food & Function*, 11(1):680-688, 2020.
- He Q, Peng H, Sheng M, Hu S, Qiu J, Gu J: Humidity control strategies for solid-state fermentation: capillary water supply by water-retention materials and negative-

- 
- pressure auto-controlled irrigation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7:263, 2019.
- Horvat A.: Utjecaj ekstruzije na svojstva smjesa pšeničnog brašna i pivskog tropa., *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,, Osijek, 2017.
- Irbe I, Elisashvili V, Asatiani MD, Janberga A, Andersone I, Andersons B, Biziks V, Grinins J: Lignocellulolytic activity of *Coniophora puteana* and *Trametes versicolor* in fermentation of wheat bran and decay of hydrothermally modified hardwoods. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86:71-78, 2014.
- Jørgensen H, Kristensen JB, Felby C: Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1(2):119–134, 2007.
- Karpe AV, Dhamale VV, Morrison PD, Beale DJ, Harding IH, Palombo EA: Winery biomass waste degradation by sequential sonication and mixed fungal enzyme treatments. *Fungal Genetics and Biology*, 102:22-30, 2017.
- Kumar V, Ahluwalia V, Saran S, Kumar J, Patel, AK, Singhania RR: Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges challenges and solutions. *Bioresource Technology*, 323:124566, 2021.
- Laca A, Laca A, Díaz M: Hydrolysis: From cellulose and hemicellulose to simple sugars. U *Second and Third Generation of Feedstocks*, str. 213-240. Poglavlje 8, Elsevier, 2019. 2019.
- Larios-Cruz R, Buenrostro-Figueroa J, Prado-Barragán A, Rodríguez-Jasso RM, Rodríguez-Herrera R, Montañez JC, Aguilar CN: Valorization of grapefruit by-products as solid support for solid-state fermentation to produce antioxidant bioactive extracts. *Waste and Biomass Valorization* 10:763-769, 2017.
- Leite, P, Sousa, D, Fernandes H, Ferreira M, Costa AR, Filipe D, Salgado JM: Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-

- 
- industrial wastes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 27:100407, 2020.
- Lekounougou S, Pe´trissans M, Jacquot JP, Gelhaye E, Ge´rardin P: Effect of heat treatment on extracellular enzymatic activities involved in beech wood degradation by *Trametes versicolor*. *Wood Science and Technology*, 43:331–341, 2009.
- Liguori R, Pennacchio A, Vandenberghe LPdeS, De Chiaro A, Birolo L, Soccol CR, Faraco V: Screening of fungal strains for cellulolytic and xylanolytic activities production and evaluation of brewers’ spent grain as substrate for enzyme production by selected fungi. *Energies*, 14:4443, 2021.
- Lizardi-Jiménez MA, Hernández-Martínez R: Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *Biotech*, 3, 7(1):44, 2017.
- Lynch KM, Steffen EJ, Arendt EK: Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122:553-568, 2016.
- Machado AS, Valadares F, Silva TF, Milagres AMF, Segato F, Ferraz A: The Secretome secretome of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor* grown in microcrystalline cellulose and use of the enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:826, 2020.
- Magalhães Jr AI, Carvalho JC, Melo Pereira GV, Karp SG, Câmara MC, Medina JDC, Soccol CR: Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(6):1505-1519, 2019.
- McKendry P: Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource technology*, 83(1):37-46, 2002.
- Mehta S, Jha S, Liang H: Lignocellulose materials for supercapacitor and battery electrodes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 134:110345, 2020.



- 
- Menon V, Rao M: Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in energy and combustion science*, 38(4):522-550, 2012.
- Mitchell D, Krieger N, Berovič M: Solid-state fermentation bioreactor fundamentals: introduction and overview. U *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*, Springer, str. 1-16. Springer, Njemačka, Berlin, 2006.
- Mohanty P, Singh PK, Adhya TK, Pattnaik R, Mishra SA: critical review on prospects and challenges in production of biomethanol from lignocellulose biomass: *Biomass Conv. Bioref.* 12, 1835–1849, 2022.
- Mussatto SI, Teixeira JA: Lignocellulose as raw material in fermentation processes. U *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, str. 897-907. Formatex Research Center, SAD, Norristown, 2010.
- Nicholas JK: The Bradford Method For Protein Quantitation. U : *The Protein Protocols Handbook*, str. 17–24. Humana Press, SAD, Totowa, treće izdanje, 2009.
- Obi, CN: Solid State Fermentation: Substrates Uses and Applications in Biomass and Metabolites Production-A Review. *South Asian Research Journal of Biology and Applied Biosciences*, 1(1):20-29, 2019.
- Reddy SS, Krishnan C: Production of prebiotics and antioxidants as health food supplements from lignocellulosic materials using multi enzymatic hydrolysis. *International Journal of Chemical Sciences*, 8(3):S535-S549, 2010.
- Scheller HV, Ulvskov P: Hemicelluloses. *Annual review of plant biology* , 61:263-289, 2010.
- Podaci za enzime: Sigma Aldrich, 2018. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en> [15.06.2023.]
- Singh A, Bajar S, Devi A, Pant D: An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*, 14:100652, 2021.

- 
- Singh Dhillon G, Kaur S, Kaur Brar K, Verma M: Flocculation and haze removal from crude beer using in-house produced laccase from *Trametes versicolor* cultured on brewer's spent grain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60:7895-7904, 2012.
- Socol CR, Costa ES de F, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LP de S: Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1): 52–71, 2017.
- Subramaniyan S, Prema P: Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1):33-64, 2002.
- Tišma M, Bucić-Kojić A, Planinić M: Bio-based products from lignocellulosic waste biomass: A State of the Art. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Chem. Biochem. Eng. Q.* 35(2):139–156, 2021. (b).
- Tišma M, Sudar M, Vasić-Rački Đ, Zelić B: Mathematical model for *Trametes versicolor* growth in submerged cultivation. *Bioprocess Biosystems* 30: 749-758, 2010.
- Tišma M, Znidaršič-Plazl P, Šelo G, Tolj I, Šperanda M, Bucić-Kojić A, Planinić M: *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy. State of the art, challenges and opportunities., *Bioresource Technology* 330:124997 330, 2021. (a).
- Veana F, Flores-Gallegos CA, Gonzalez-Montemayor MA, Michel-Michel M, Lopez-Lopez L, Aguilar-Zarate P, Ascacio-Valdés AJ, Rodríguez-Herrera R: Invertase: an enzyme with importance in confectionery food industry. *Enzymes in Food Technology*, str. 187-204. Springer, Singapur Nature, Singapore, 2018.
- Yu W, Quek W, Li C, Gilbert R, Fox G: Effects of the starch molecular structures in barley malts and rice adjuncts on brewing performance. *Fermentation*, 4:103, 2018.
- Zeko-Pivač A, Tišma M, Žnidaršič-Plazl P, Kulisić B, Sakellaris G, Hao J, Planinić M: The potential of brewer's spent grain in the circular bioeconomy: State of the art and future perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10:870744, 2022.