

Utjecaj biotransformacije pivskog tropa s *Trametes versicolor* na ekstraktibilnost šećera

Kelemen, Kristina

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:109:139227>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Kristina Kelemen

**UTJECAJ BIOTRANSFORMACIJE PIVSKOG TROPA S *TRAMETES*
VERSICOLOR NA EKSTRAKTIBILNOST ŠEĆERA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj
Franje Kuhača 18, 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 X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 17. srpnja 2023.**Mentor:** prof. dr. sc. *Marina Tišma***Pomoć pri izradi:** *Anđela Matić*, mag.ing.proc.**Utjecaj biotransformacije pivskog tropa s *Trametes versicolor* na ekstraktibilnost šećera***Kristina Kelemen, 0113144940***Sažetak:**

U ovom radu korišten je pivski trop kao supstrat za uzgoj *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima. Tijekom rasta mikroorganizma, mjerene su aktivnosti hidrolitičkih enzima (β -glukozidaza, celulaza, ksilanaza i invertaza), koncentracije ukupnih reducirajućih šećera te koncentracije ukupnog organskog ugljika i dušika. Fermentacija na čvrstim nosačima provedena je pri sljedećim početnim procesnim uvjetima: $T = 27^{\circ}\text{C}$, $t = 15$ dana, m (supstrat) = 30 g, početni udio vlage = 64,65%. Gubitak na masi materijala nakon 15 dana fermentacije iznosio je 25,32%, a pH supstrata se tijekom fermentacije mijenjao od pH 6,14 do pH 6,62. Najveća volumna aktivnost invertaze postignuta je nakon 14. dana fermentacije i iznosila je V.A. = 331,858 U/mL. Najveća volumna aktivnost ksilanaze postignuta je nakon 15. dana fermentacije i iznosila je V.A. = 104,852 U/mL. Najveća volumna aktivnost β -glukozidaze postignuta je nakon 15. dana fermentacije i iznosila je V.A. = 2,239 U/mL, a najveća volumna aktivnost celulaze V.A. = $0,043 \pm 0,005$ FPU/mL zabilježena je nakon 14. dana fermentacije. Nakon 15 dana fermentacije došlo je do porasta koncentracije ukupnih reducirajućih šećera (2,9 puta), ukupnog organskog ugljika (2,95 puta) i ukupnog organskog dušika (3,6 puta) u biološki modificiranom pivskom tropu u odnosu na početni uzorak pivskog tropa. Međutim, najveća koncentracija ukupnih reducirajućih šećera izmjerena je nakon 6. dana fermentacije i iznosila je 14,379 mg_{glukoze}/g_{st}, pri čemu je došlo do povećanja koncentracije reducirajućih šećera za 3,4 puta u odnosu na početni uzorak pivskog tropa.

Ključne riječi: *Trametes versicolor*, pivski trop, fermentacija na čvrstim nosačima**Rad sadrži:** 44 stranica
23 slika
1 tablica
52 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** Hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

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

Datum obrane: 29. rujna 2023.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process engineering
Subdepartment of Energy, Environment and Sustainable Development
Franje Kuhača 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. X held on July 17, 2023.

Mentor: *Marina Tišma*, Full prof.

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

Influence of biotransformation of Brewer's Spent Grain with *Trametes versicolor* on sugar extractability

Kristina Kelemen, 0113144940

Summary: (up to 200 words)

In this work, brewer's spent grain was used as a substrate for the cultivation of *Trametes versicolor* under solid-state fermentation conditions. During the growth of microorganisms, the activities of hydrolytic enzymes (β -glucosidase, cellulase, xylanase and invertase), the concentration of total reducing sugars and the concentration of total organic carbon and nitrogen were measured. Solid-state fermentation was carried out under the following initial process conditions: $T = 27^{\circ}\text{C}$, $t = 15$ days, m (substrate) = 30 g, initial moisture content = 64.65%. The mass loss of material after 15 days of fermentation was 25.32%, and the pH of the substrate varied from pH 6.14 to pH 6.62 during fermentation. The highest volume activity of invertase was achieved after the 14th day of fermentation and was $V.A. = 331.858$ U/mL. The highest volume activity of xylanase was achieved after the 15th day of fermentation and was $V.A. = 104.852$ U/mL. The highest volume activity of β -glucosidase was achieved after the 15th day of fermentation and was $V.A. = 2.239$ U/mL, while the highest volume activity of cellulase was measured after the 14th day of fermentation as $V.A. = 0.043$ FPU/mL. After 15 days of fermentation, there was an increase in the concentration of total reducing sugars (2.9 times), total organic carbon (2.95 times) and total organic nitrogen (3.6 times) in the biologically modified brewer's spent grain compared to the initial brewer's spent grain sample. However, the highest concentration of total reducing sugars was measured after the 6th day of fermentation and was 14.379 mg_{glucose}/g_{st}, where the concentration of reducing sugars increased by 3.4 times compared to the initial sample of brewer's spent grain.

Key words: *Trametes versicolor*, brewer's spent grain, solid-state fermentation

Thesis contains: 44 pages
23 figures
1 table
52 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: September 29, 2023

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

Zahvaljujem...

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. GLJIVE BIJELOG TRULJENJA	4
2.1.1. <i>Trametes versicolor</i>	5
2.2. LIGNOCELULOZNI MATERIJALI	5
2.2.1. Pivski trop	7
2.2.2. Fermentacija na čvrstim nosačima	8
2.3. HIDROLITIČKI ENZIMI U RAZGRADNJI LIGNOCELULOZE	9
2.3.1. β -glukozidaze	10
2.3.2. Celulaze	11
2.3.3. Ksilanaze	11
2.3.4. Invertaze	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. ZADATAK	14
3.2. MATERIJALI	14
3.2.1. Mikroorganizam i supstrat.....	14
3.2.2. Kemikalije	15
3.2.3. Priprema otopina.....	15
3.3. METODE	16
3.3.1. Fermentacija na čvrstim nosačima	16
3.3.2. Određivanje gubitka mase i pH vrijednosti supstrata	17
3.3.3. Udio suhe tvari.....	18
3.3.4. Ekstrakcija enzima	19
3.3.5. Mjerenje aktivnosti enzima	20
3.3.6. Mjerenje koncentracije ukupnih reducirajućih šećera	24
3.3.7. Mjerenje koncentracije tekućeg ugljika i dušika.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. UZGOJ TRAMETES VERSICOLOR U UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA NA PIVSKOM TROPU	27
4.2. PROIZVODNJA HIDROLITIČKIH ENZIMA UZGOJEM TRAMETES VERSICOLOR U UVJETIMA FERMENTACIJE NA ČVRSTIM NOSAČIMA NA PIVSKOM TROPU	28
4.2.1. Proizvodnja enzima β -glukozidaze uzgojem <i>Trametes versicolor</i> u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pivskom tropu.....	28
4.2.2. Proizvodnja enzima celulaze uzgojem <i>Trametes versicolor</i> u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pivskom tropu	30
4.2.3. Proizvodnja enzima ksilanaze uzgojem <i>Trametes versicolor</i> u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pivskom tropu	31
4.2.4. Proizvodnja enzima invertaze uzgojem <i>Trametes versicolor</i> u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pivskom tropu	32
4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNIH REDUCIRAJUĆIH ŠEĆERA	33
4.3.1. Određivanje koncentracije tekućeg ugljika i dušika	35

5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	39

Popis oznaka, kratica i simbola

OZNAKE:

Da	unificirana jedinica mase atoma [$1,6605 \cdot 10^{-27}$ kg]
γ	masena koncentracija tvari [g/L]
rcf	relativna centrifugalna sila (1 rcf=1 g, $g=9,81$ m/s ²)
S.A.	specifična aktivnost enzima [U/mg]
V.A.	volumna aktivnost enzima [U/mL]
U	međunarodna jedinica enzimске aktivnosti [μ mol/min]
dA/dt	promjena apsorbancije u vremenu [1/min]
λ	valna duljina [nm]
C_{DNS}	maseni udio reducirajućih šećera izmjeren DNS metodom [mg/g _{st}]
γ_{DNS}	masena koncentracija reducirajućih šećera izmjerena DNS metodom [mg/mL]
V_{eks}	volumen ekstrakta [mL]
FR	faktor razrjeđenja
w_{st}	udio suhe tvari [%]

1. UVOD

Trametes versicolor, poznata i kao gljiva bijelog truljenja, prirodno raste na drvenom materijalu, prilikom čega sintetizira lignolitičke (lakaza, lignin-peroksidaza, mangan-peroksidaza i dr.) i hidrolitičke (celulaza, β -glukozidaza, ksilanaza, invertaza, i dr.) enzime (Tišma i sur., 2021a).

Pivski trop, nusproizvod proizvodnje piva, je lignocelulozni materijal s potencijalom za primjenu u različitim biotehnološkim procesima. Sastoji se od hemiceluloze, celuloze, lignina i proteina. S obzirom da ovaj nusproizvod u velikoj količini završava kao otpad, njegovom valorizacijom moguće je smanjiti potrošnju energije u pivovarama, troškove zbrinjavanja te smanjenje negativnog utjecaja otpada na okoliš (Zeko-Pivač i sur., 2022).

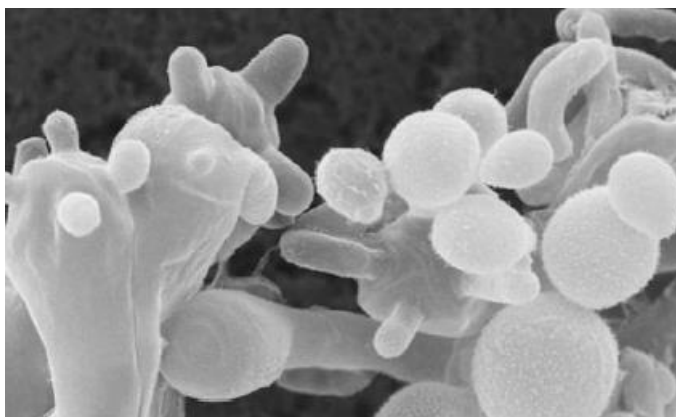
Fermentacija na čvrstim nosačima (SSF) je proces koji omogućava rast i razmnožavanje mikroorganizama na lignoceluloznim materijalima u kontroliranim uvjetima. Ovaj proces se primjenjuje u proizvodnji enzima, bioaktivnih spojeva, organskih kiselina, ali i u proizvodnji biogoriva. Tijekom fermentacije, uslijed katalitičke aktivnosti hidrolitičkih enzima, oslobađaju se jednostavni šećeri iz složenih polisaharida, koji se dalje mogu upotrebljavati u proizvodnji biogoriva (primjerice bioetanola) i visokovrijednih proizvoda (primjerice mliječna kiselina) (Lizardi-Jiménez i sur., 2017).

Cilj ovog istraživanja bio je uzgojiti *Trametes versicolor* na pivskom tropu kao hranjivoj podlozi, analizirati aktivnost hidrolitičkih enzima (celulaza, β -glukozidaza, ksilanaza i invertaza) te mjeriti koncentraciju oslobođenih jednostavnih šećera, kao posljedicu aktivnosti ovih enzima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. GLJIVE BIJELOG TRULJENJA

Gljive bijelog truljenja predstavljaju skupinu organizama s izvanrednom sposobnošću razgradnje lignoceluloznih materijala. Građene su od hifa, dugih stanica koje su međusobno povezane u mrežu poznatu kao micelij (**Slika 1**). Ta mreža se proteže kroz supstrat na kojem gljive rastu i omogućuje im da apsorbiraju hranjive tvari iz okoline. Ove gljive rastu na odumrlom drveću, drvenom materijalu i ostatcima biljnih materijala (Hatakka, 2001).



Slika 1 Mikroskopski prikaz micelija gljive bijelog truljenja (Kaur, 2021)

Ovi makroskopski organizmi imaju ključnu ulogu u prirodnim ekosustavima, pridonoseći razgradnji organskog materijala, posebno drvenastog biljnog materijala. Pripadaju skupini basidiomiceta koje su često povezane s „bijelim truljenjem“ odnosno bijelom bojom koja je vidljiva na odumrlim deblima drveća. Ovisno o kemijskom sastavu supstrata na kojem rastu, gljive bijelog truljenja izlučuju različite izvanstanične enzime koji zajedničkim djelovanjem doprinose razgradnji lignoceluloznih komponenata supstrata (Sigoillot & Lesage-Meessen, 2003).

Razgradnja lignoceluloznog materijala, koji čini strukturu biljnih staničnih zidova, ključan je proces u prirodi jer ima velik utjecaj na ekološke cikluse i očuvanje ekosustava. Lignin, celuloza i hemiceluloza su tri glavne komponente ovog materijala, a svaka od njih ima svoju specifičnu ulogu u biljnim stanicama. Razgradnja lignina u najvećoj mjeri rezultat je katalitičkih aktivnosti enzima lignin-peroksidaze (LiP), mangan-peroksidaze (MnP) i lakaze (Wong, 2009).

Značajna svojstva gljiva bijelog truljenja su njihova otpornost na različite uvjete okoline, uključujući širok raspon pH vrijednosti i temperature. Osim toga, ove gljive su u stanju tolerirati prisutnost različitih toksičnih spojeva, zbog čega mogu opstati u prirodi. Istraživanja

ovih gljiva usmjerena su na razumijevanje njihovog rasta, proizvodnje enzima i molekularne biologije. Velik broj studija provodi se kako bi se rješavali problemi visoke učinkovitosti biodegradacije u različitim kontekstima, uključujući i primjene u biotehnologiji. U tu svrhu, istraživane su različite metode poboljšanja proizvodnje enzima, uključujući uporabu inhibitora rasta poput nistatina i drugih antibiotika (Zhang i sur., 2023).

2.1.1. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor je gljiva bijelog truljenja iz razreda *Basidiomycota*. Njezina posebnost leži u raznolikim bojama koje može poprimiti u prirodi, od čega je dobila i svoje ime (lat. *Trametes* – mršav; *versicolor* – u više boja). Ova gljiva prirodno se nalazi na raznim vrstama tvrdog drveća, ali može biti prisutna i na nekim četinjačama. Često je vidljiva tijekom cijele godine na panjevima i deblima drveća. Njezina prisutnost može uzrokovati pojavu „bijeleg truleži“, zbog čega pripada grupi gljiva bijelog truljenja. Kada raste u prirodi, *Trametes versicolor* koristi složen sustav izvanstaničnih lignolitičkih enzima kako bi razgradila lignin (Tišma i sur., 2021a).

Najpoznatiji lignolitički enzimi su lignin-peroksidaze, mangan-peroksidaze i lakaze. Lakaza ima sposobnost katalitičke razgradnje lignina, aromatskih ugljikovodika, polikloriranih bifenila te sintetskih boja (Tavares, 2005).

U laboratorijskim uvjetima, *Trametes versicolor* se uzgaja na dva različita načina: submerznim uzgojem (SmF) ili uzgojem na čvrstim supstratima (SSF). Uzgoj na čvrstim nosačima (SSF) omogućuje ovoj gljivi rast na različitim vrstama čvrstih materijala, pri čemu su kao supstrati najčešće upotrebljavaju lignocelulozni materijali. U mnogim slučajevima, proizvod ovog uzgoja na čvrstim supstratima je modificirana lignocelulozna biomasa koja se može koristiti proizvodnji biogoriva (bioplina) ili kao stočna hrana (Tišma i sur., 2021a).

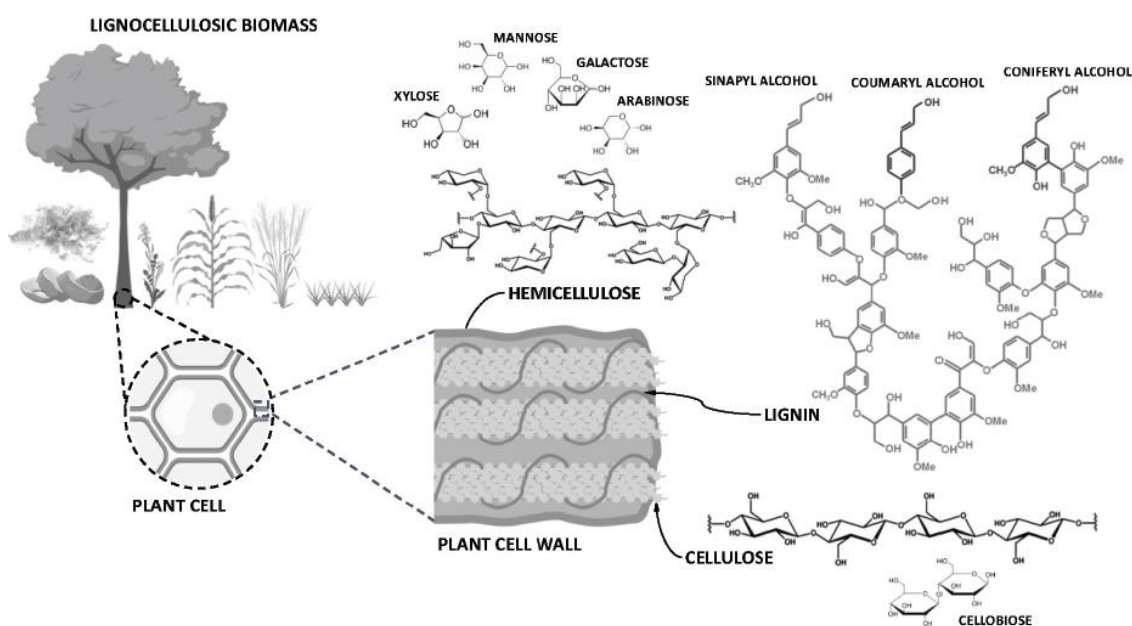
Trametes versicolor predstavlja primjer kako gljive bijelog truljenja mogu imati širok spektar primjena, primjerice u industriji, medicini i ekologiji. Naime, *Trametes versicolor* se može upotrebljavati u bioremedijaciji tla, ali i proizvodnju glikopeptida za antikancerogenu terapiju (Desai i Nityanand, 2011).

2.2. LIGNOCELULOZNI MATERIJALI

Lignocelulozni materijali su obnovljivi i bogati izvor lignina, celuloze i hemiceluloze, koje pojedinačno, nakon izolacije i pročišćavanja, mogu biti sirovine u mnogim biotehnološkim

aplikacijama. Ova vrsta biomase se često koristi za proizvodnju bioenergije, no sve više se prepoznaje njezin potencijal kao sirovine za proizvodnju visokovrijednih kemikalija. Lignoceluloza se smatra obilnim i ekonomičnim alternativnim izvorom fosilnih resursa te igra ključnu ulogu u postizanju ciljeva održivog gospodarenja resursima (Magalhães i sur., 2019).

Sastav lignocelulozne biomase varira ovisno o vrsti i izvoru, no osnovne komponente uključuju lignin, celulozu i hemicelulozu (**Slika 2**). Celuloza, koja je najobilnija komponenta, sastoji se od molekula glukoze povezanih beta-1,4 glikozidnim vezama i formira kristalnu strukturu. Hemiceluloza, s druge strane, sastoji se od različitih monosaharida, kao što su galaktani, ksilani, manani i arabani, te je manje kristalna i lakše razgradiva od celuloze. Lignin je kompleksni aromatski heteropolimer koji daje čvrstoću biljnoj staničnoj stijenci (Tišma i sur., 2021).



Slika 2 Shematski prikaz lignina, celuloze i hemiceluloze kao glavnih komponenti lignocelulozne biomase (Tišma i sur., 2021)

Važno je napomenuti da upotreba lignocelulozne biomase nije ograničena samo na energetiku i kemijsku industriju. Novi pristupi i tehnologije omogućuju njezinu primjenu u tekstilnoj industriji, biomedicinskim istraživanjima, te za bioremedijaciju zagađenih područja (Mehta et al., 2020). Osim toga, lignocelulozna biomasa može igrati ključnu ulogu u postizanju održivosti u svemirskim istraživanjima u vidu proizvodnje biogoriva poput bioetanola, biodizela ili

bioplina. Zbog povećanja populacije i industrijalizacije dolazi do neprestanog opterećivanja postojećih energetskih resursa te iscrpljivanja globalnih rezervi fosilnih goriva, upravo korištenje alternativnih obnovljivih izvora energije poput biogoriva, predstavlja ekološki prihvatljivije rješenje za suočavanje s tim izazovima. Lignocelulozna biomasa nudi najekonomičniju biomasu za proizvodnju biogoriva. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja za komercijalnu proizvodnju učinkovitog biotransformacijskog procesa za proizvodnju biogoriva iz lignocelulozne biomase (Shabih i sur., 2018).

U konačnici, upravljanje lignoceluloznom biomasom ima potencijal poboljšati kvalitetu okoliša, proširiti ljudsko razumijevanje prirode i utjecati na lokalne ekonomije i zajednice. S obzirom na njenu obilnost i biotehnološki potencijal, lignoceluloza će vjerojatno ostati ključnim izvorom za različite industrijske sektore u budućnosti (Menon & Rao, 2012).

2.2.1. Pivski trop

Pivski trop je nusproizvod proizvodnje piva koji nastaje nakon kuhanja sladovine tijekom procesa proizvodnje piva. Ovaj materijal, koji čini oko 85% ukupnih sporednih proizvoda u pivarstvu, predstavlja značajan resurs za različite primjene, s obzirom na bogat nutritivni sastav. Pivski trop sadrži različite komponente, uključujući vlakna (celuloza, hemiceluloza, lignin), proteine, škrob, minerale, vitamine i fenolne spojeve (Lynch i sur., 2016).

Kemijski sastav pivskog tropa (**Tablica 1**) ovisi o različitim čimbenicima, uključujući vrstu ječma, vrijeme žetve, uvjete klijanja i proces ukomljavaanja sa surogatima koji se koriste u proizvodnji sladovine. Također, tip piva koji se proizvodi može utjecati na sastav pivskog tropa, budući da on može sadržavati ostatke ječmenog slada ili neslađenih sirovina (Horvat, 2017).

Pivski trop dobar je supstrat za uzgoj mikroorganizama u procesu fermentacije na čvrstim nosačima, što rezultira proizvodnjom visokovrijednih proizvoda, uključujući i enzime (Zeko-Pivač i sur., 2022). Kroz inovacije u prehrambenoj, energetskoj i industrijskoj primjeni, pivski trop može postati ključni čimbenik u stvaranju održivijih i resursno učinkovitijih industrijskih procesa (Zeko-Pivač i sur., 2022).

Tablica 1 Sastav pivskog tropa (Pejin i sur., 2013)

Komponenta	w_{st} [%]
Celuloza	14,7 – 16,8
Hemiceluloza	23,0 – 32,5
Lignin	12,6 – 27,8
Proteini	15,3 – 21,5
Masti	11,7
Mineralne tvari	3,4 – 4,8
Škrob	6 – 12,5

2.2.2. Fermentacija na čvrstim nosačima

Fermentacija na čvrstim nosačima (eng. "solid-state fermentation", SSF) je biotehnološki proces u kojem se krute tvari koriste kao supstrati za rast mikroorganizama u odsutnosti ili minimalnoj prisutnosti slobodne vode. U ovom procesu, čvrsti supstrat mora sadržavati od 60-80% vlage za podršku rasta i metabolizma mikroorganizama (Leite i sur., 2020). Za uspješno provođenje fermentacije, potrebno je odabrati prikladan supstrat i mikroorganizam, te optimizirati različite parametre kao što su početna vlažnost supstrata, pH, temperatura, veličina čestica supstrata, koncentracija i starost inokuluma, itd.

Izbor odgovarajućih mikroorganizama i supstrata ključan je u razvoju SSF procesa. Filamentozne gljive su često pogodne za SSF jer njihov način rasta omogućuje prodiranje u čvrste supstrate radi iskorištavanja hranjivih tvari te su otporne na nedostatak slobodne vode. Kvasci i neke vrste bakterija, poput *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* i *Lactobacillus sp.*, također mogu rasti u uvjetima niske aktivnosti vode na čvrstim supstratima (Soccol i sur., 2017; Obi, 2019).

Supstrati koji se koriste u SSF procesima obično su složeni, heterogeni lignocelulozni materijali, porijeklom iz poljoprivrede, šumarstva ili prehrambene tehnologije. Priprema ovih supstrata obično uključuje rezanje, mljevenje, usitnjavanje ili granuliranje, kemijsku ili enzimsku hidrolizu radi povećanja dostupnosti hranjivih tvari, dodatak hranjivih tvari i elemenata u tragovima te pasterizaciju ili sterilizaciju radi uklanjanja kontaminanata (Mitchell i sur., 2006; Obi, 2019).

Proces SSF uključuje sterilizaciju bioreaktora, dodavanje prethodno pripremljenog supstrata i inokuluma mikroorganizma u sterilnim uvjetima, te kontrolu ključnih parametara fermentacije kao što su vlažnost supstrata i temperatura rasta mikroorganizama (Mitchell i sur., 2006).

SSF ima različite primjene, uključujući proizvodnju enzima, antibiotika, bioaktivnih spojeva i organskih kiselina, kao i proizvodnju biogoriva kao što su bioetanol i biodizel koji predstavljaju alternativne izvore energije (Lizardi-Jiménez i sur., 2017).

Prednosti SSF uključuju smanjen rizik od inhibicije supstratom, mogućnost proizvodnje enzima visokih aktivnosti i stabilnosti, nisku potrošnju energije, produljenu stabilnost proizvoda, niže troškove proizvodnje i smanjene količine otpadnih procesnih struja, osobito otpadne vode. Primjerice, korištenje poljoprivrednih i šumarskih ostataka kao supstrata čini ovaj proces ekonomski isplativijim i ekološki prihvatljivijim. Nedostaci SSF procesa su akumulacija topline zbog metaboličkih aktivnosti i heterogene prirode supstrata, otežan proces prijenosa kisika te nemogućnost odvajanja biomase od supstrata (Kumar i sur., 2021).

2.3. HIDROLITIČKI ENZIMI U RAZGRADNJI LIGNOCELULOZE

Struktura lignoceluloze je iznimno složena i izazovna za razgradnju, budući da se sastoji od različitih komponenata, celuloze, hemiceluloze i lignina, međusobno povezanih različitim kemijskim vezama. Ta složenost čini lignocelulozu izazovnim supstratom za razgradnju i pretvorbu u visokovrijedne proizvode i/ili biogoriva. Komponente lignoceluloze su međusobno povezane vodikovim vezama, dok su između hemiceluloze i lignina prisutne kovalentne veze (Jørgensen, 2007).

Jedan od glavnih čimbenika koji doprinose kompleksnosti lignoceluloznih materijala i otpornosti na razgradnju, je prisutnost lignina. Lignin je polimer koji štiti celulozu i daje čvrstoću biljnim vlaknima. Također, celuloza ima visoku kristalnost i stupanj polimerizacije, a

njezina površina je teško dostupna enzimima. Da bi se efikasno razgradila, potrebno je niz enzima, poput celobiohidrolaze (egzo-1,4- β -D-glukanaze) koje djeluju duž celuloznog lanca i kataliziraju cijepanje celobiozne jedinice s krajeva lanca, endo-1,4- β -D-glukanaze koje kataliziraju hidrolizu unutarnje β -1,4-glukozidne veze u celuloznom lancu nasumično te β -glukozidaze koje kataliziraju hidrolizu celobioze do glukoze (Laca i sur., 2019).

Hemiceluloza se sastoji od različitih šećera kao što su ksiloza, arabinoza, manosa i drugi. Za potpunu hidrolizu hemiceluloze koriste se različite hemicelulaze: endo-1,4- β -D-ksilanaze, 1,4- β -D-ksilozidaze, endo-1,4- β -D-mananaze, 1,4- β -D-manozidaze (Biswas i sur., 2014).

Razgradnju lignina uglavnom kataliziraju enzimi poput lakaza, mangan-peroksidaza i lignin-peroksidaza (Andlar i sur., 2018).

Jedan od izazova u industrijskoj primjeni lignolitičkih enzima je njihova relativno visoka cijena. Zbog toga su istraživanja usmjerena na poboljšanje učinkovitosti enzima, identifikaciju novih i aktivnijih enzima, razvoj koktela enzima te smanjenje troškova proizvodnje. Ova istraživanja imaju potencijal da unaprijede industrijske procese koji koriste lignocelulozu kao sirovinu i pridonose održivijem pristupu u industriji (Jørgensen, 2007).

2.3.1. β -glukozidaze

β -glukozidaze su enzimi prisutni u raznim mikroorganizmima, uključujući gljive truležnice, mikorizne gljive, biljne patogene i neke bazidiomicetne kvasce. Ova raznolikost izvora ukazuje na važnost ovih enzima u različitim ekosustavima. Dosad izolirane β -glukozidaze pokazuju visoku strukturalnu raznolikost. Njihove molekulske mase variraju od 35 do 640 kDa. Također, ovi enzimi mogu postojati kao monomeri ili kao homo-oligomerni kompleksi. Dodatno, β -glukozidaze nisu ograničene samo na katalitičku hidrolizu celobioze. Mnoge β -glukozidaze su glikozilirane, iako se udio šećera u njima razlikuje (Baldrian i Valaškova, 2008).

Struktura β -glukozidaze također pokazuje znatnu varijabilnost. Na primjer, *Phanerochaete chrysosporium* proizvodi β -glukozidazu molekulske mase 300 kDa koja je monomerni glikoprotein s visokim stupnjem glikozilacije. Ova strukturalna raznolikost odražava različite funkcije i specifičnosti enzima u različitim okruženjima (Baldrian i Valaškova, 2008).

β -glukozidaze imaju široku industrijsku primjenu. Primjerice, koriste se u proizvodnji biogoriva, gdje kataliziraju hidrolizu celobioze do glukoze koju mikroorganizmi mogu dalje

metabolizirati u svrhu proizvodnje biogoriva, poput bioetanola. Osim toga, β -glukozidaze se koriste u proizvodnji visokovrijednih spojeva i proizvoda u biotehnološkim procesima. Njihova sposobnost da razgrade različite šećere čini ih korisnim u prehrambenoj industriji, industriji celuloze i papira, te drugim granama industrije (Bajaj i Mahajan, 2019).

2.3.2. Celulaze

Celulaza, također poznata kao endo- β -1,4-glukanaza (endo- β -1,4-D-glukan 4-glukanohidrolaza, EC 3.2.1.4), je ključni enzim koji igra važnu ulogu u razgradnji celuloze. Aktivnost endoglukanaze ili celulaze, prvenstveno je zabilježena kod bazidiomiceta.

Celulaza može imati molekulsku masu između 22 i 45 kDa. Endoglukanaze proizvedene iz organizama poput *Phanerochaete chrysosporium* sadrže veliku katalitičku domenu i aktivno mjesto za vezanje celuloze od 4 kDa koje se može odvojiti cijepanjem, obično uz uporabu enzima poput papaina. Međutim, važno je napomenuti da neke endoglukanaze manje molekulske mase nemaju aktivno mjesto za vezanje celuloze (Baldrian i Valaškova, 2008).

Endoglukanaze iz bazidiomiceta pokazuju optimalnu aktivnost u rasponu pH vrijednosti od 4,0 do 5,0, što je blisko pH vrijednostima drveta koje je kolonizirano ovim gljivama. Temperaturni optimum za katalitičke reakcije endoglukanaza kreće se između 50 i 70 °C (Baldrian i Valaškova, 2008).

Primjena celulaze u industriji je široka i raznolika. Jedna od najznačajnijih primjena je u proizvodnji bioetanola iz lignoceluloznih materijala, što predstavlja ključnu tehnologiju za proizvodnju biogoriva drugih generacija. Osim toga, celulaza se koristi u mnogim drugim industrijama, uključujući prehrambenu industriju, industriju celuloze i papira, biotehnologiju, tekstilnu industriju, poljoprivredu, farmaceutsku industriju te industriju stočne hrane (Singh i sur., 2021). Ova raznovrsna primjena celulaze ukazuje na njenu ključnu ulogu u raznim industrijama i naglašava važnost istraživanja usmjerenih na unaprjeđenje učinkovitosti ovih enzima, kako bi se smanjili troškovi proizvodnje i potaknulo održivo korištenje lignoceluloznih resursa.

2.3.3. Ksilanaze

Ksilanaze, poznate i kao endo-1,4- β -ksilanaze (1,4- β -D-ksilanohidrolaze, E.C.3.2.1.8) imaju ključnu ulogu u katalitičkoj hidrolizi hemiceluloze pri čemu dolazi do oslobađanja ksiloze koja

se može koristiti kao supstrat za proizvodnju različitih bioproizvoda. Ksilanaze su izolirane iz različitih izvora, primjerice gljiva i bakterija. Neki od ovih enzima, posebno oni iz gljiva, pokazuju izvanrednu stabilnost i aktivnost u ekstremnim uvjetima, što ih čini vrijednim za razne industrijske primjene (Bajaj i Mahajan, 2019).

Ksilanaze iz gljiva su posebno zanimljive jer pokazuju visoku aktivnost i stabilnost u širokom temperaturnom rasponu, obično između 60 i 80 °C. Ovi enzimi su često glikoproteini, a njihova aktivnost varira ovisno o pH vrijednosti okoliša. Većina ksilanaza pokazuje najveću aktivnost pri kiselom pH, dok se raspon pH za njihovu aktivnost kreće između 3 i 8, ovisno o izvoru iz kojeg su izolirane. Molekulske mase ksilanaza također su varijabilne i kreću se u rasponu od 6 do 38 kDa (Subramaniyan i Prema, 2002; Bajpai, 2014).

2.3.4. Invertaze

Invertaze ili β -fruktozidaze (EC 3.2.1.26) imaju ulogu u hidrolizi različitih fruktofuranozida, uključujući disaharide, trisaharide i fruktane poput inulina, a proizvode ih različiti mikroorganizmi i više gljive (Veana i sur., 2018).

Invertaza katalizira hidrolizu terminalnih nereducirajućih krajeva β -fruktofuranozida. Glavna primarna reakcija je hidroliza saharoze na ekvimolarnu smjesu glukoze i fruktoze, poznatu kao invertni šećer. Ovaj proces ostvaruje se pri širokom pH optimumu. Invertni šećer dobiven ovom reakcijom je bezbojan i moguće je ostvariti veći prinos u usporedbi s onim dobivenim kiselinskom hidrolizom (Perelković i sur., 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je:

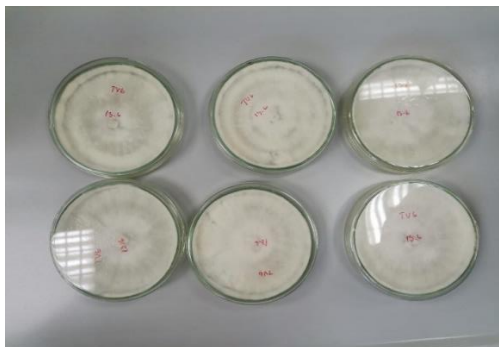
- a) Provesti fermentaciju na čvrstim nosačima koristeći pivski trop kao supstrat i *T. versicolor* kao radni mikroorganizam
- b) Analizirati promjenu u sastavu supstrata tijekom svakog dana fermentacije, što uključuje mjerenje udjela suhe tvari, pH-vrijednosti te gubitaka na masi supstrata.
- c) Mjeriti aktivnosti hidrolitičkih enzima *T. versicolor* (celulaze, β -glukozidaze, invertaze i ksilanaze) tijekom fermentacije
- d) Mjeriti koncentraciju oslobođenih reducirajućih šećera tijekom fermentacije
- e) Analizirati koncentraciju ugljika i dušika tijekom fermentacije

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Mikroorganizam i supstrat

U ovom istraživačkom radu kao supstrat korišten je pivski trop iz Osječke pivovare u Osijeku, Hrvatska. Pivski trop podvrgnut je postupku sušenja na temperaturi od 45°C tijekom 48 sati, nakon čega je pohranjen na temperaturi od 25°C.

Za provođenje fermentacije korišten je specifični soj mikroorganizma, gljive bijelog truljenja poznate kao *Trametes versicolor* TV-6. Kultura ovog mikroorganizma uzgajana je na krumpirovom dekstroza agaru proizvedenom od strane Liofilchem S.r.l., Via Scozia, Roseto degli Abruzzi TE, Italija, tijekom 14 dana pri temperaturi od 27°C (**Slika 3**). Ovaj proces proveden je u inkubatoru bez ventilacije proizvedenom od strane BINDER GmbH iz Tuttlingena, Njemačka.



Slika 3 Gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor* u PDA (starost kulture: 14 dana)

3.2.2. Kemikalije

3.2.3. Priprema otopina

Krumpirov dekstroza agar

Priprema krumpirovog dekstroza agara započeta je suspendiranjem 10,5 g krumpirovog dekstroza agara u 250 mL destilirane vode, nakon čega je otopina sterilizirana u autoklavu na 121 °C tijekom 15 minuta. Djelomično ohlađena otopina krumpirovog dekstroza agara, prenesena je u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice i korištena je kao podloga za naciepljivanje *T. versicolor* u sterilnim uvjetima.

1 M citratni pufer

Za pripremu 1 M citratnog pufera, u 750 mL destilirane vode dodano je 200 g monohidrata citratne kiseline. Uz neprestano miješanje, postupno su dodavane NaOH mini perle kako bi se pH korigirao na 4,3. Zatim je tikvica nadopunjena vodom do ukupnog volumena od 1 L, uz dodatnu korekciju pH na 4,5.

0,05 M citratni pufer

Priprema 0,05 M citratnog pufera uključivala je razrjeđivanje otopine 1 M citratnog pufera, uz korekciju pH vrijednosti na pH 5,3 dodatkom 1 M NaOH.

0,1 M acetatni pufer

Za pripremu 0,1 M acetatnog pufera korištene su dvije otopine: otopina A koja se sastoji od 2,3 mL ledene octene kiseline otopljene u 200 mL destilirane vode te otopina B koja se sastoji od 10,88 g natrij-acetata ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$) otopljenog u 400 mL destilirane vode. Te dvije otopine su pomiješane u 500 mL destilirane vode, pri čemu je pH korigiran na 5,0.

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

Priprema 0,02 M *p*-4-nitrofenil β -D-glukopiranoze uključivala je otapanje 0,603 g *p*-4-nitrofenil β -D-glukopiranoze u 100 mL 0,1 M acetatnog pufera pri pH vrijednosti od pH 5,1.

0,2 M natrijev karbonat

Priprema 0,2 M natrijevog karbonata obuhvaćala je otapanje 10,60 g natrijevog karbonata u 500 mL destilirane vode.

1 % arabinoksilan

Za pripremu 1 % arabinoksilana, 0,3 g arabinoksilana je otopljeno u 30 mL 0,05 M citratnog pufera pri pH vrijednosti od 5,3.

0,2 M saharoza

0,2 M saharoza pripremljena je otapanjem 2 g saharoze u 20 mL 0,1 M acetatnog pufera pri pH vrijednosti od 4,5.

DNS reagens

Za pripremu DNS reagensa, 10,9 g 3,5-dinitrosalicilne kiseline je otopljeno u 400 mL 50%-tne otopine NaOH uz zagrijavanje i miješanje na 70 °C. Zatim je dodano 150 g Na-K-tartarata tetrahidrata, ohlađeno i nadopunjeno destiliranom vodom do ukupnog volumena od 500 mL u odmjernoj tikvici.

3.3. METODE

3.3.1. Fermentacija na čvrstim nosačima

Metoda fermentacije na čvrstim nosačima prilagođena je prema metodi autora Bucić-Kojić i suradnici (2020). Na početku, u laboratorijske staklenke volumena 720 mL izvagano je 30 g osušenog pivskog tropa, nakon čega je dodano 50 mL destilirane vode (**Slika 4**). Sadržaj u laboratorijskim staklenkama pažljivo je promiješan i potom steriliziran u autoklavu na temperaturi od 121 °C tijekom 15 minuta.



Slika 4 Uzorci pivskog tropa u laboratorijskim staklenkama prije inokulacije mikroorganizmom

Nakon završetka sterilizacije, laboratorijske posude su stavljene na hlađenje na sobnoj temperaturi. Zatim je supstrat inokuliran micelijskim diskovima *Trametes versicolor* koji su prethodno uzgojeni na PDA agaru. Kako bi se provela inokulacija, 5 micelijskih diskova *Trametes versicolor* promjera 1 cm, suspendirano je u 10 mL sterilne destilirane vode, a zatim preneseno u svaku od laboratorijskih posuda pod sterilnim uvjetima. Fermentacija je provedena u inkubatoru, bez prisilne ventilacije, na temperaturi od 27 °C tijekom 15 dana.

3.3.2. Određivanje gubitka mase i pH vrijednosti supstrata

Za mjerenje pH vrijednosti supstrata nakon svakog dana fermentacije, izvagano je 2 g fermentiranog supstrata, koji je zatim pomiješan s 10 mL destilirane vode. Ekstrakcija je provedena koristeći uređaj za vrtložno miješanje (Vortex MX-S, DLAB Scientific, Kina), prikazan na **Slici 5**, u vremenskom razmaku od 5 minuta, tijekom 30 minuta. Nakon ekstrakcije, pH vrijednost je određena pomoću pH metra, prikazanog na **Slici 6**. Tijekom eksperimenta, praćen je i gubitak mase supstrata vaganjem laboratorijske staklenke sa sadržajem (supstrat i mikroorganizam), nakon svakog dana fermentacije.



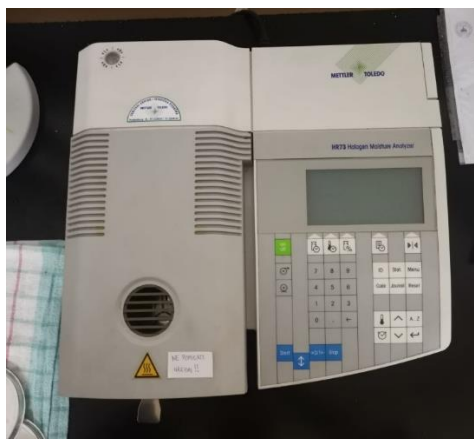
Slika 5 Vortex miješalica (Vortex MX-S, DLAB Scientific, Kina)



Slika 6 pH metar (HI 2211, Njemačka)

3.3.3. Udio suhe tvari

Određivanje udjela suhe tvari provedeno je primjenom termogravitacijske metode na analizatoru vlage za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo), koji je prikazan na **Slici 7**. Za analizu, svakodnevno je odvagano 1 g fermentiranog uzorka i postavljen na aluminijski podložak. Sušenje je provedeno na temperaturi od 105 °C i odvijalo se sve dok nije postignuta konstantna masa.



Slika 7 Analizator vlage (HR-73, Mettler Toledo)

3.3.4. Ekstrakcija enzima

Tijekom svakog dana fermentacije, uzorkovano je 2 g fermentiranog materijala i dodano je 10 mL odgovarajućeg pufera za mjerenje enzimske aktivnosti. Prilikom određivanja aktivnosti enzima ksilanaze, fermentirani materijal pomiješan je s 0,05 M citrat puferom (pH 5,3). Za mjerenje aktivnosti invertaze korišten je 0,1 M acetatni pufer (pH 4,5), za β -glukozidazu 0,1 M acetatni pufer (pH 5,1), a za mjerenje aktivnosti celulaze 0,05 M citratni pufer (pH 4,8). Ekstrakcija je provedena na vorteksu tijekom 30 minuta, s intervalima od 5 minuta. Zatim su uzorci centrifugirani u centrifugi (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka), prikazanoj na **Slici 8**, pri brzini od 10000 rpm, 5 minuta. Dobiveni supernatant korišten je za mjerenje aktivnosti hidrolitičkih enzima.



Slika 8 Centrifuga (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)

3.3.5. Mjerenje aktivnosti enzima

Aktivnosti hidrolitičkih enzima određene su spektrofotometrijski (UV-1280 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japan) (**Slika 9**) na pripadajućim valnim duljinama, u skladu s metodama za mjerenje aktivnosti pojedinog enzima koje su opisane dalje u tekstu. Volumne i specifične aktivnosti enzima izračunate su prema sljedećim formulama:

$$V.A. = \frac{dA}{dT} \cdot \frac{f_{\text{razrjeđivanja}} \cdot V_{\text{reakcije}}}{\varepsilon \cdot V_E \cdot d} \quad [\text{U/mL}]$$

Oznake:

- $V.A$ – enzimska volumna aktivnost [U/mL]
- $\frac{dA}{dT}$ – promjena apsorbancije u vremenu [1/min]
- $f_{\text{razrjeđivanja}}$ – faktor razrjeđenja
- V_{reakcije} – ukupan volumen reakcijske smjese u kiveti [mL]
- ε – ekstinkcijski koeficijent [L/(mmol cm)]
- V_E – volumen kivete [mL]
- d – promjer kivete [cm]

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_{\text{enzim}}} \quad [\text{U/mL}]$$

Oznake:

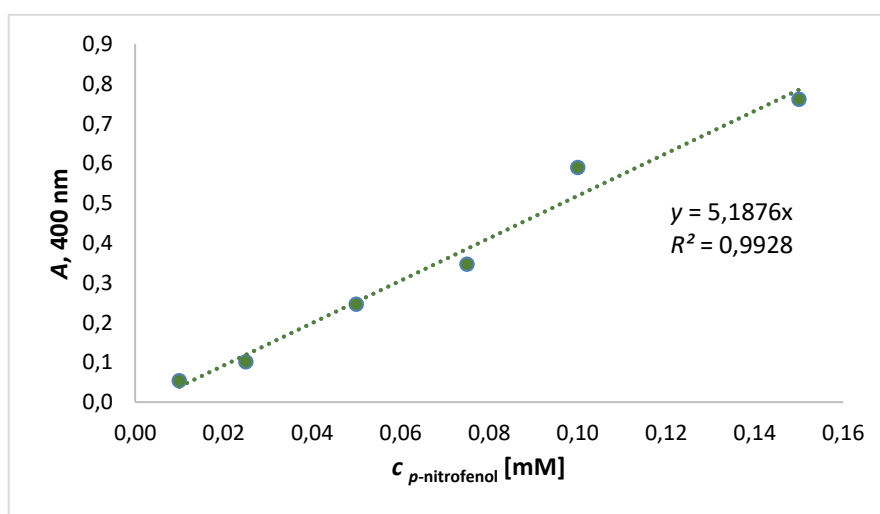
- $S.A$ – specifična aktivnost enzima [U/mg]
- $V.A$ – enzimska volumna aktivnost [U/mL]
- γ_{enzim} – masena koncentracija enzima [mg/mL]



Slika 9 Spektrofotometar (UV-1280 UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japan)

Mjerenje aktivnosti β -glukozidaze

Za mjerenje aktivnosti β -glukozidaze korištena je modificirana metoda autora Karpe i sur. (2017) te spektrofotometrijsko mjerenje pri valnoj duljini $\lambda = 400$ nm. Kao supstrat korištena je 0,02 M *p*-4-nitrofenil β -D-glukopiranoza, a za određivanje koncentracije *p*-nitrofenola upotrijebljena je prethodno napravljena baždarna krivulja (**Slika 10**). U epruveti je pomiješano 0,25 mL otopine supstrata, 0,5 mL 0,1 M acetatnog pufera (pH 5,0), i 0,25 mL ekstrakta enzima β -glukozidaze. Nakon miješanja, smjesa je inkubirana na 50 °C tijekom 5 minuta u vodenoj kupelji. Nakon završene inkubacije, u epruvetu je dodan 1 mL natrijevog karbonata s ciljem detekcije *p*-nitrofenola. Slijepa proba provedena je bez dodatka ekstrakta enzima β -glukozidaze.



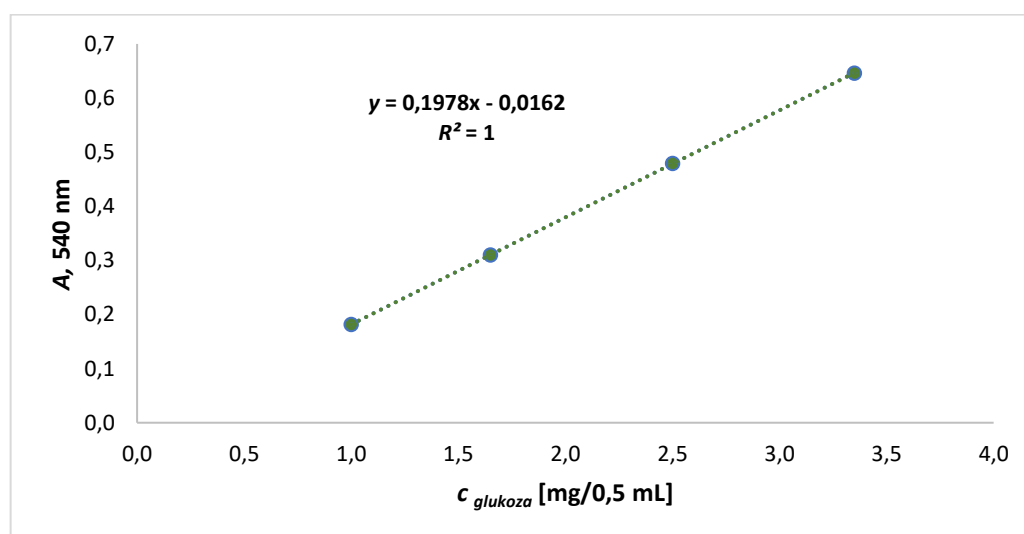
Slika 10 Baždarna krivulja za određivanje koncentracije *p*-nitrofenola

Mjerenje aktivnosti celulaze

Za određivanje aktivnosti celulaze korištena je modificirana metoda autora Adney i Baker (2008). Kako bi se odredila aktivnost ovog enzima koji katalizira hidrolizu celulozu na jednostavnije šećere, korištena je baždarna krivulja za određivanje koncentracije glukoze (**Slika 11**). Kao supstrat korišten je filter papir (1,0 x 6,0 cm) . U epruvetu je dodan filter papir, 1 mL 50 mM citratnog pufera (pH 4,8) i 0,5 mL ekstrakta celulaze. Nakon miješanja, smjesa je inkubirana u vodenoj kupelji na 50 °C tijekom 60 minuta. Nakon završene inkubacije, u epruvetu je dodano 3 mL DNS reagensa, miješano na vortexu i ponovno inkubirano na 100°C tijekom 5 minuta. DNS reagens je korišten za detekciju reducirajućih šećera, uključujući glukozu. Nakon 5 minuta hlađenja, u 0,2 mL smjese dodano je s 2,5 mL destilirane vode u svrhu razrjeđenja te je izmjerena apsorbancija. Prije početka mjerenja pripremljena je slijepa proba bez dodatka supstrata i ekstrakta enzima te slijepa probe u svrhu kontrole enzima i supstrata. Zbog korištenja filter papira kao supstrata, aktivnost enzima celulaze iskazana je kao FPU (eng. „Filter paper units“) koja predstavlja količinu enzima koja oslobodi 2 mg reducirajućih šećera iz 50 mg filter papira tijekom jednog sata, a može se izračunati prema sljedećoj formuli:

$$FPU = \frac{0,37}{V_{enzima\ koji\ oslobađa\ 2\ mg\ glukoze}} [FPU/mL]$$

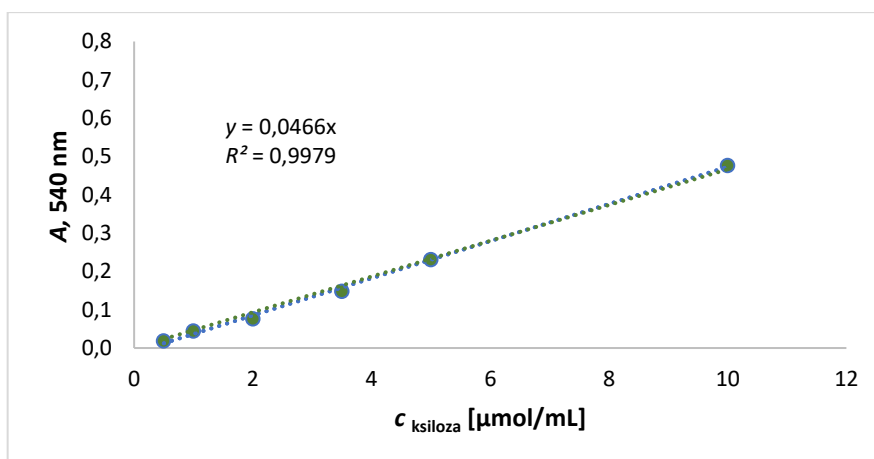
Vrijednost u brojniku dobivena je prevođenjem 2 mg glukoze u ekvivalentan broj molova u odnosu na korišteni volumen enzima i vremena inkubacije.



Slika 11 Baždarna krivulja za određivanje koncentracije glukoze

Mjerenje aktivnosti ksilanaze

Mjerenje aktivnosti ksilanaze temeljeno je na modificiranoj metodi prema autoru Bailey i suradnicima (1992). Kao supstrat korišten je 1 % arabinoksilan, budući da ksilanaza katalizira razgradnju ovog supstrata do ksiloze. U epruvetu je dodano 0,9 mL otopine 1%-tnog arabinoksilana i 0,1 mL ekstrakta ksilanaze, nakon čega je provedena inkubacija u vodenoj kupelji na 50 °C tijekom 5 minuta. Nakon izvršene inkubacije, dodano je 1,5 mL DNS reagensa i provedena je 5-minutna inkubacija na 100°C u vodenoj kupelji. Priprema slijepa probe uključuje inkubaciju 0,9 mL otopine supstrata na 50°C tijekom 5 minuta, nakon čega se dodaje 1,5 mL DNS reagensa i 0,1 mL 0,05 M citratnog pufera (pH = 5,3). Slijepa proba za kontrolu enzima provedena je također inkubacijom 0,9 mL otopine supstrata pri jednakim uvjetima, gdje je umjesto citratnog pufera dodano 0,1 mL ekstrakta enzima ksilanaze. Za mjerenje koncentracije ksiloze u svrhu izračunavanja aktivnosti enzima, korištena je baždarna krivulja za određivanje koncentracije ksiloze (**Slika 12**).

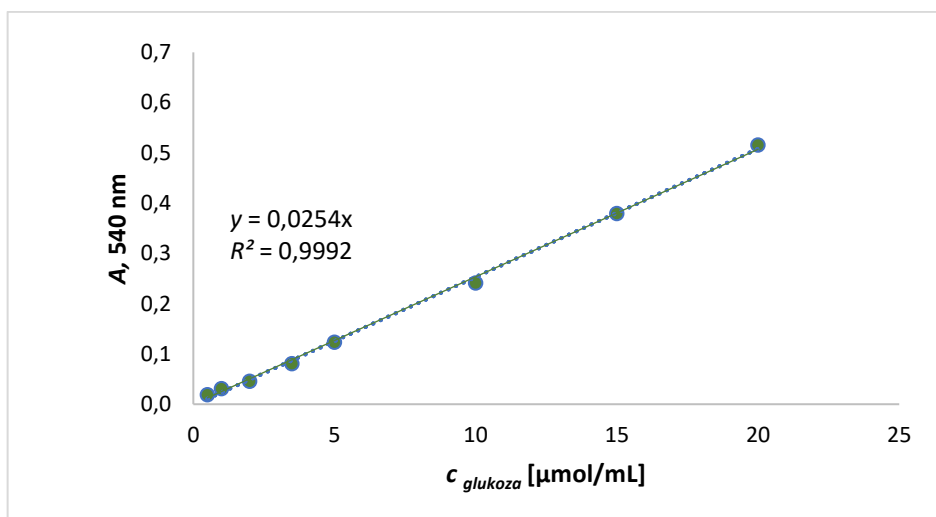


Slika 12 Baždarna krivulja za određivanje ksiloze

Mjerenje aktivnosti invertaze

Mjerenje aktivnosti invertaze provedeno je prema modificiranoj metodi autora Margetić i Vujčić (2017). Kao je supstrat korištena 0,3 M otopina saharoze koju invertaza hidrolizira na jednostavnije šećere, glukozu i fruktozu, zbog čega je za izračun aktivnosti enzima invertaze korištena baždarna krivulja za određivanje koncentracije smjese glukoze i fruktoze s jednakim molarnostima (**Slika 13**). Prije provođenja mjerenja priprema se slijepa proba koja uključuje inkubaciju 0,4 mL otopine supstrata u vodenoj kupelji na 50°C tijekom 5 minuta te naknadno

dodavanje 0,5 mL DNS reagensa i 0,1 mL acetatnog pufera (pH= 4,5). Također, pri istim uvjetima pripremljena je slijepa proba za kontrolu enzima u koju je dodano 0,1 mL ekstrakta enzima umjesto acetatnog pufera. Glavna proba obuhvaća inkubaciju smjese 0,4 mL supstrata i 0,1 mL ekstrakta enzima tijekom 5 minuta na 50°C, nakon čega se dodaje 0,5 mL DNS reagensa. Prije spektrofotometrijskog određivanja sve probe se ponovno inkubiraju u vodenoj kupelji tijekom 5 minuta na 100°C, hlade i razrjeđuju s 4 mL destilirane vode.



Slika 13 Baždarna krivulja za određivanje koncentracije smjese glukoze i fruktoze

3.3.6. Mjerenje koncentracije ukupnih reducirajućih šećera

Koncentracija reducirajućih šećera mjerena je spektrofotometrijski prema modificiranoj metodi autora Miller (1959). Izračunavanje masene koncentracije reducirajućih šećera provodi se prema formuli dobivenoj iz jednadžbe baždarnog pravca nakon izmjerene apsorbancije uzorka pri 540 nm. Jednadžba baždarnog pravca dobivena je korištenjem standarda glukoze.

$$\gamma_{DNS} = 0,3353 \cdot A_{540} + 0,0211 \text{ [mg/mL]}$$

Maseni udio reducirajućih šećera izračunat je iz masene koncentracije reducirajućih šećera prema sljedećoj formuli:

$$C_{DNS} = \frac{\gamma_{DNS} \cdot V_{eks} \cdot FR}{m_{uz} \cdot \left(\frac{w_{st}}{100}\right)} \text{ [mg/g}_{st}\text{]}$$

Oznake:

- C_{DNS} – maseni udio reducirajućih šećera izmjeren DNS metodom [mg/g_{st}]

- γ_{DNS} – masena koncentracija reducirajućih šećera izmjerena DNS metodom [mg/mL]
- V_{eks} – volumen ekstrakta [mL]
- FR – faktor razrjeđenja
- m_{uz} – masa uzorka [g]
- w_{st} – udio suhe tvari [%]

3.3.7. Mjerenje koncentracije tekućeg ugljika i dušika

Prilikom određivanja količine ukupnog tekućeg organskog ugljika i tekućeg dušika, prethodno pripremljeni ekstrakti su odvrgnuti katalitičkoj oksidaciji pri 680°C pomoću analizatora ugljika i dušika (TOC- $L_{CPH/CPN}$) (Slika 14). Maseni udjeli tekućeg organskog ugljika i tekućeg dušika izračunati su iz masenih koncentracija prema sljedećim formulama:

$$C_{TOC} = \frac{\gamma_{TOC} \cdot V_{eks} \cdot FR}{m_{uz} \cdot \left(\frac{w_{st}}{100}\right)} \quad [\text{mg/g}_{st}]$$

$$C_{TN} = \frac{\gamma_{TN} \cdot V_{eks} \cdot FR}{m_{uz} \cdot \left(\frac{w_{st}}{100}\right)} \quad [\text{mg/g}_{st}]$$



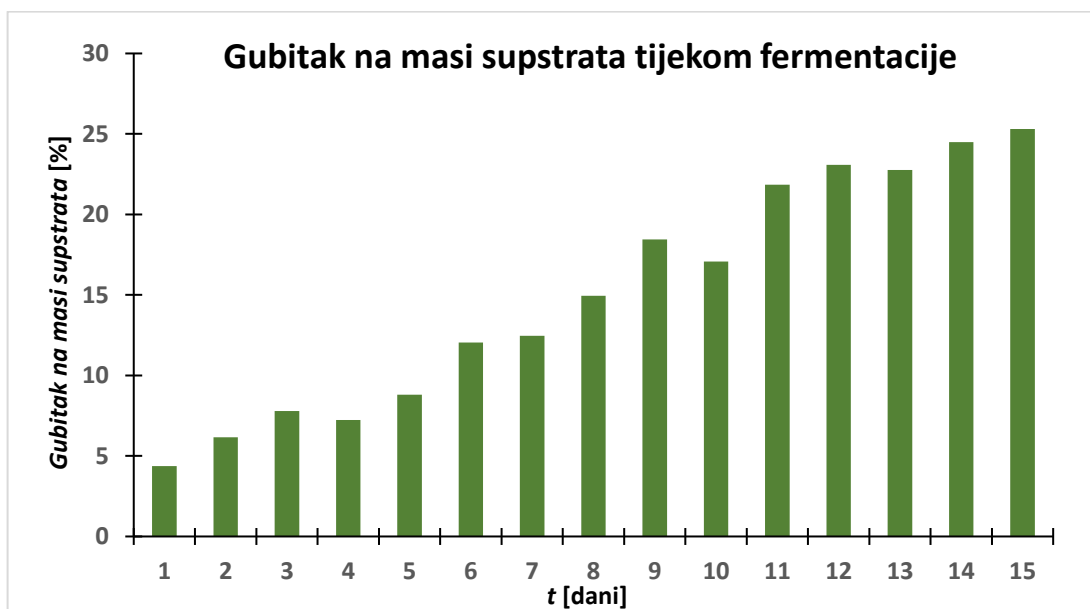
Slika 14 Shimadzu TOC analizator SSM-5000A

4. REZULTATI I RASPRAVA

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

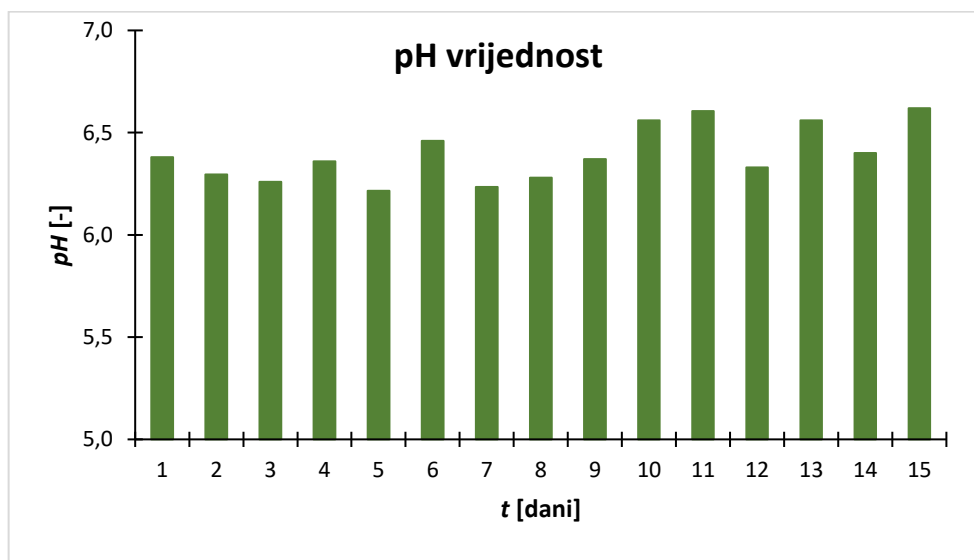
Kultivacija *Trametes versicolor* na pivskom tropu provedena je u laboratorijskim staklenkama tijekom 15 dana. Tijekom fermentacije, vlažnost supstrata održavana je unutar optimalnog raspona, varirajući između 61,61% i 68,38%. Ovaj optimalan raspon vlage ključan je za poticanje rasta *Trametes versicolor*. Precizna kontrola vlage u procesu fermentacije na čvrstim nosačima ima veliku važnost jer čvrsti supstrat mora sadržavati odgovarajuću količinu dostupne vlage kako bi omogućio rast i razvoj radnog mikroorganizama. Prekomjerna količina vode mogla bi uzrokovati zbijanje supstrata, povećati rizik od kontaminacije i otežati prijenos kisika. S druge strane, nedostatak vlage mogao bi ograničiti transport hranjivih tvari do mikroorganizma i inhibirati rast mikroorganizma te posljedično, sintezu željenih enzima (He i sur., 2019).

Tijekom 15 dana fermentacije, izmjeren je gubitak ukupne mase supstrata od 25,32%. Ovaj gubitak mase supstrata, odnosno razgradnja, povezan je s aktivnostima kompleksa enzima mikroorganizma koji su odgovorni za katalitički razgradnju matrice supstrata tijekom fermentacije na čvrstim nosačima (Larios-Cruz i sur., 2019). Rezultati gubitka mase tijekom 15 dana fermentacije prikazani su na **Slici 15**.



Slika 15 Grafički prikaz gubitka na masi supstrata tijekom 15 dana fermentacije uzgojem *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Vrijednosti pH supstrata varirale su tijekom 15 dana fermentacije u rasponu od 6,14 do 6,62, ali nije došlo do znatnog sniženja pH vrijednosti odnosno stvaranja kisele sredine. Rezultati promjene pH vrijednosti tijekom cijelog 15-dnevnog razdoblja fermentacije prikazani su na Slici 16.

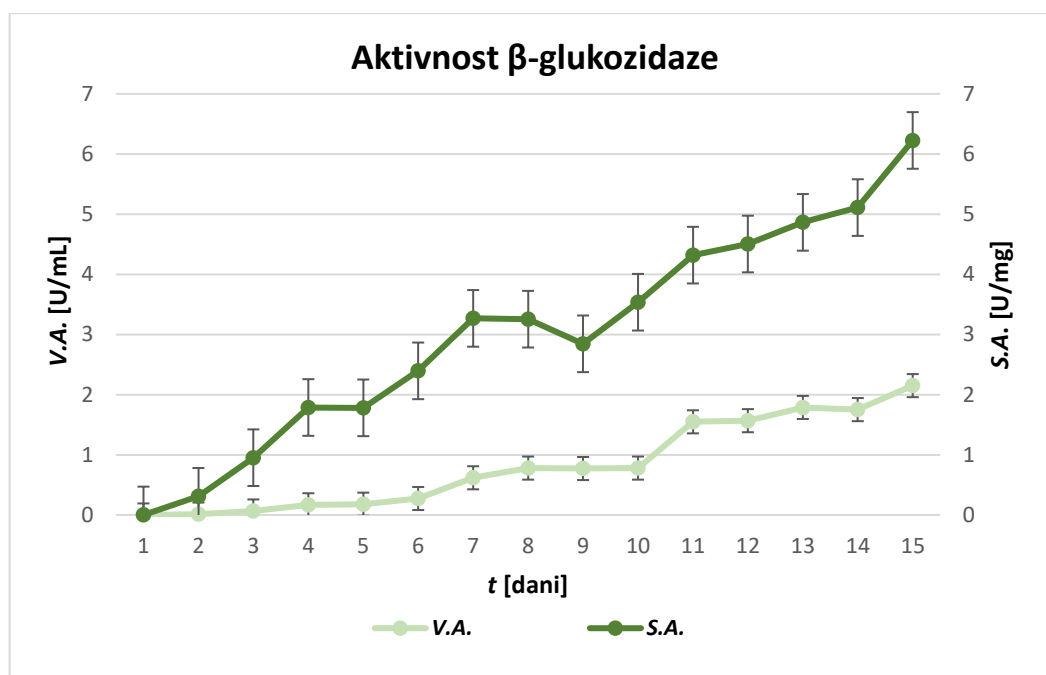


Slika 16 Grafički prikaz pH vrijednosti supstrata tijekom 15 dana fermentacije uzgoja *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

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

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

Rezultati volumne (V.A.) i specifične aktivnosti (S.A.) enzima β -glukozidaze tijekom rasta *Trametes versicolor* na pivskom tropu prikazani su na Slici 17.



Slika 17 Grafički prikaz aktivnosti enzima β -glukozidaze tijekom 15 dana fermentacije

Najveća volumna aktivnost β -glukozidaze postignuta je nakon 15. dana fermentacije i iznosila je $2,239 \pm 0,217$ U/mL, dok je najveća specifična aktivnost postignuta nakon 15. dana fermentacije i iznosila je $6,226 \pm 0,208$ U/mg. Ovi rezultati ukazuju na sposobnost gljive *Trametes versicolor* TV-6 za proizvodnju β -glukozidaze i potvrđuju njezin potencijal za industrijsku primjenu u proizvodnji ovog enzima, ali za industrijski značajnije aktivnosti ovog enzima, potrebno je optimirati proces proizvodnje.

Bernal-Uriz i suradnici (2022) su istraživali tretiranje pivskog tropa (Tocancipá, Kolumbija) s *Penicillium* HC1 u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (SSF) i postigli su najveću volumnu aktivnost enzima β -glukozidaze nakon 12 dana fermentacije, koja je iznosila $4,491 \pm 0,169$ U/mL, što je duplo veća aktivnost od aktivnosti izmjerene u ovom diplomskom radu.

Pershad i Bisaria (2014) su proučavali *Streptomyces* sp. koji je proizveo β -glukozidazu visoke volumne aktivnosti od 137 U/mL tijekom rasta na karboksimetil celulozi. Također, *Trichoderma harzianum* P49P11 je proizvela β -glukozidazu s volumnom aktivnošću od 17,32 U/mL koristeći bagasu šećerne trske.

Lekounougou i suradnici (2009) su istraživali aktivnost β -glukozidaze iz *Trametes versicolor* u uvjetima SSF-a te su postigli najveću aktivnost enzima 10. dana fermentacije (500 U) koristeći drvo breze kao supstrat. Također, pokazali su da termički tretirani supstrat breze nije

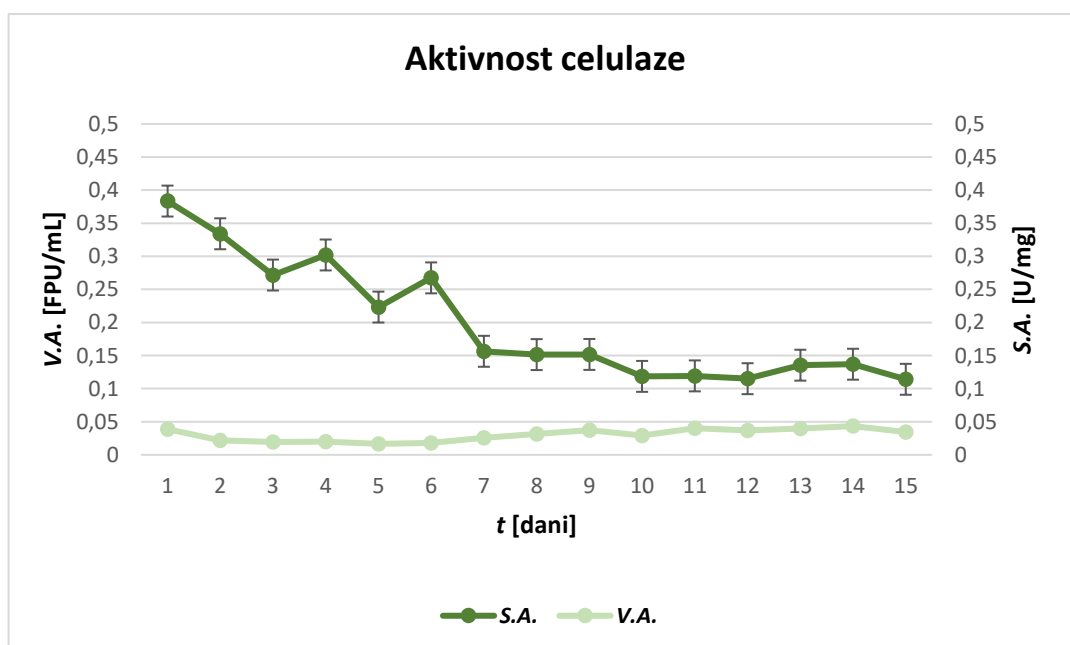
pogodovao proizvodnji enzima, što sugerira da mogućnost upotrebe nesterilnog lignoceluloznog materijala kao supstrata za uzgoj mikroorganizama i sintezu enzima, čime bi se mogli smanjiti troškovi proizvodnje zbog manjeg utroška energije.

Machado i suradnici (2020) su koristili mikrokristalnu celulozu kao supstrat u uvjetima SSF-a s *Trametes versicolor* i postigli su specifičnu aktivnost β -glukozidaze od 20,0 U/mg nakon 12 dana fermentacije.

Ovi rezultati ukazuju na raznolikost mikroorganizama i supstrata te njihovu sposobnost za proizvodnju β -glukozidaze u različitim uvjetima i na različitim supstratima.

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

Rezultati aktivnosti enzima celulaze tijekom rasta *Trametes versicolor* na pivskom tropu prikazani su na **Slici 18**. Iz tih rezultata vidljivo je da su najveće volumne aktivnosti celulaze zabilježene nakon 14. dana fermentacije, a iznosile su $0,043 \pm 0,005$ FPU/mL. S druge strane, najveća specifična aktivnost enzima zabilježena je nakon 1. dana fermentacije i iznosila je $0,384 \pm 0,052$ FPU/mg.



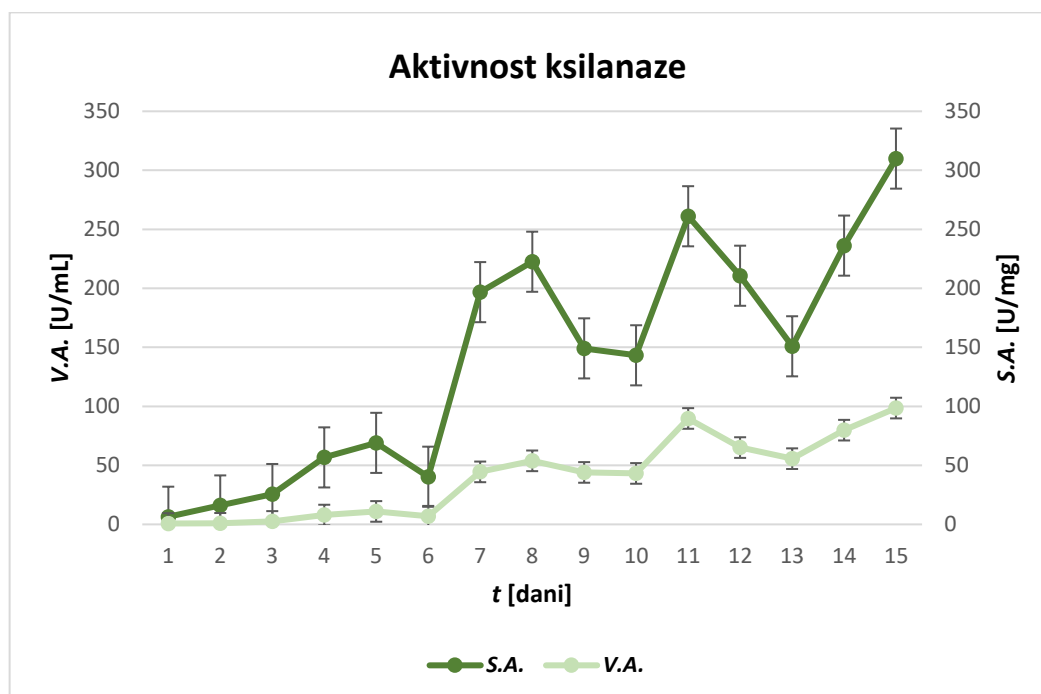
Slika 18 Grafički prikaz aktivnosti enzima celulaze tijekom 15 dana fermentacije

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju uspoređeni su s relevantnim istraživanjima iz literature. Liguori i suradnici (2021) istraživali su proizvodnju celulaze iz mikroorganizma *Aspergillus niger* LPB-334, koristeći pivski trop iz craft pivovare Manebo (Striano, Napulj, Italija) kao supstrat za fermentaciju na čvrstim nosačima. U njihovom istraživanju najveća postignuta specifična aktivnost je $0,118 \pm 0,008$ U/mg na SSF. Također, isti mikroorganizam postigao je najveću volumnu aktivnost celulaze od $0,27 \pm 0,04$ U/mL tijekom submerznog uzgoja. To ukazuje na visoku učinkovitost *Aspergillus niger* LPB-334 u proizvodnji celulaze.

Machado i suradnici (2020) uzgajali su *Trametes versicolor* na mikrokristalnoj celulozi (Avicel), postižući specifičnu aktivnost celulaze od 0,13 FPU/mg proteina nakon 12 dana fermentacije.

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

Rezultati aktivnosti enzima ksilanaze tijekom rasta *Trametes versicolor* na pivskom tropu prikazani su na **Slici 19**. Graf jasno pokazuje da su najveće volumne i specifične aktivnosti ksilanaze postignute nakon 15. dana fermentacije te su iznosile $104,852 \pm 12,189$ U/mL i $309,942 \pm 5,193$ U/mg.



Slika 19 Grafički prikaz aktivnosti enzima ksilanaze tijekom 15 dana fermentacije

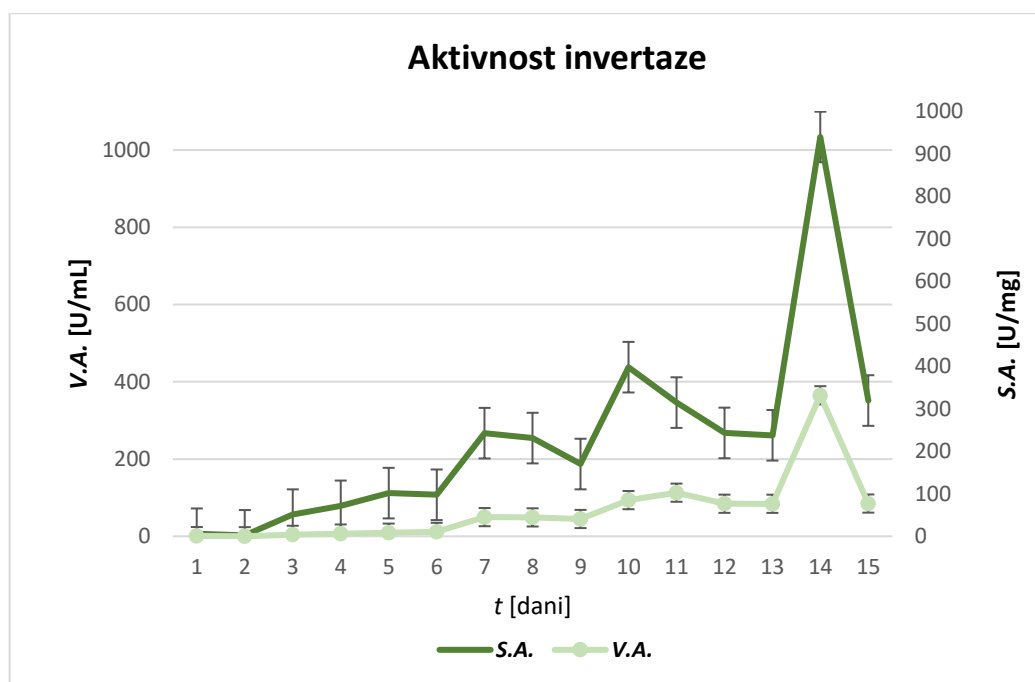
Liguori i sur. (2021) su istraživali proizvodnju ksilanaze u uvjetima SSF-a te su identificirali *Aspergillus niger* LPB-334 kao najboljeg proizvođača ksilanaze između 32 ispitana mikroorganizma uzgojena na pivskom tropu. Ovaj mikroorganizam ostvario je najvišu specifičnu aktivnost ksilanaze od $1,315 \pm 0,038$ U/mg. Submerznim uzgojem istog mikroorganizma postignuta je volumna aktivnost od $19,18 \pm 6,2$ U/mL.

Irbe i sur. (2014) su proučavali uzgoj nespecificiranog soja *Trametes versicolor* na pšeničnim mekinjama kao supstratu te su postigli proizvodnju ksilanaze s najvećom volumnom aktivnošću od $4,0 \pm 0,52$ U/mL nakon 14 dana fermentacije. Također, Bernal-Uriz i sur. (2022) su uzgojem *Penicillium* HC1 na pivskom tropu u Tocancipá, Kolumbija, proizveli ksilanazu visoke volumne aktivnosti od $16,233 \pm 1,87$ U/mL nakon 12 dana fermentacije.

Machado i sur. (2020) su proveli uzgoj *Trametes versicolor* na mikrokristalnoj celulozi i postigli najvišu specifičnu aktivnost endo-ksilanaze od 894 U/mg te β -ksilanaze od 9,6 U/mg nakon 12 dana fermentacije.

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

Rezultati aktivnosti enzima invertaze tijekom rasta *Trametes versicolor* na pivskom tropu prikazani su na **Slici 20**. Najveća volumna aktivnost ostvarena je nakon 14. dana fermentacije, iznosila je $331,858 \pm 18,744$ U/mL, dok je najveća specifična zabilježena nakon 14. dana fermentacije i iznosila je $1033,840 \pm 71,361$ U/mg.



Slika 20 Grafički prikaz aktivnosti enzima invertaze tijekom 15 dana fermentacije

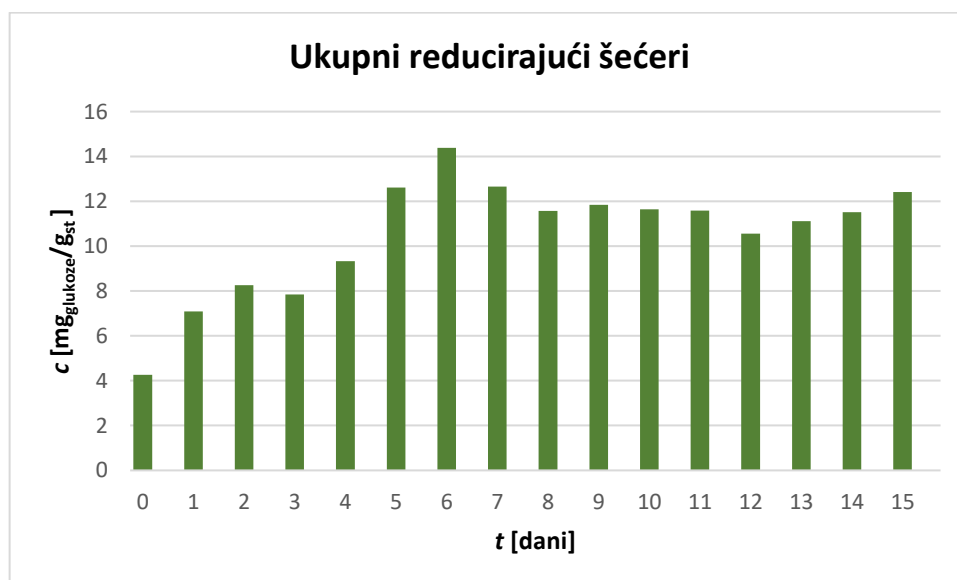
Prema literaturi, *Aspergillus oryzae* FS4 je istaknuti proizvođač invertaze s najvećom specifičnom aktivnosti od 1858,2 U/mg (Veana i sur., 2018), dok je soj bakterije *Bacillus subtilis* pokazao volumnu aktivnost invertaze od 0,39 U/mL na supstratu dobivenom od različitih lignoceluloznih materijala (smjesa pšenične mekinje bez ulja i škroba, ostatci šećerne trske, mladi izdanci bambusa i ljuske riže) (Reddy i Krishnam, 2010).

4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNIH REDUCIRAJUĆIH ŠEĆERA

Tijekom rasta *Trametes versicolor* na pivskom tropu dolazi do oslobađanja šećera iz hemiceluloznih i celuloznih komponenti. Početna koncentracija ukupnih reducirajućih šećera u supstratu iznosila je 4,263 mg_{glukoze}/g_{st.}. Nakon 6 dana fermentacije postignuta je maksimalna koncentracija reducirajućih šećera, 3,4 puta veća u odnosu na početnu, u iznosu od 14,379 mg_{glukoze}/g_{st.}. Nakon 6. dana fermentacije koncentracija ukupnih reducirajućih šećera se smanjuje (**Slika 21**). Prema Eliopoulos i sur. (2022) pretpostavlja se da *Trametes versicolor* koristi fermentabilne šećere kao izvor energije za svoj rast. Zadnji dan fermentacije koncentracija ukupnih reducirajućih šećera povećala se za 2,9 puta u odnosu na početnu vrijednost i iznosila je 12,410 mg_{glukoze}/g_{st.}

U istraživanju Zeko-Pivač i sur. (2022) početna koncentracija ukupnih reducirajućih šećera značajno se razlikovala između dva istraživana uzorka pivskog tropa. U prvom uzorku, koncentracija ukupnih reducirajućih šećera iznosila je $2,72 \text{ mg}_{\text{glukoze}}/\text{g}_{\text{st}}$, dok je u drugom bila $37,66 \text{ mg}_{\text{glukoze}}/\text{g}_{\text{st}}$. Tako širok raspon i razlika u koncentracijama reducirajućih šećera između dva uzorka pivskog tropa može se pripisati vrsti sirovina korištenih u procesu proizvodnje piva, kao i metodama ukomljavanja. U prvom uzorku pivskog tropa nakon 13 dana fermentacije, koncentracija ukupnih reducirajućih šećera se povećala na $19,56 \text{ mg}_{\text{glukoze}}/\text{g}_{\text{st}}$, dok se u drugom uzorku smanjila na $21,07 \text{ mg}_{\text{glukoze}}/\text{g}_{\text{st}}$.

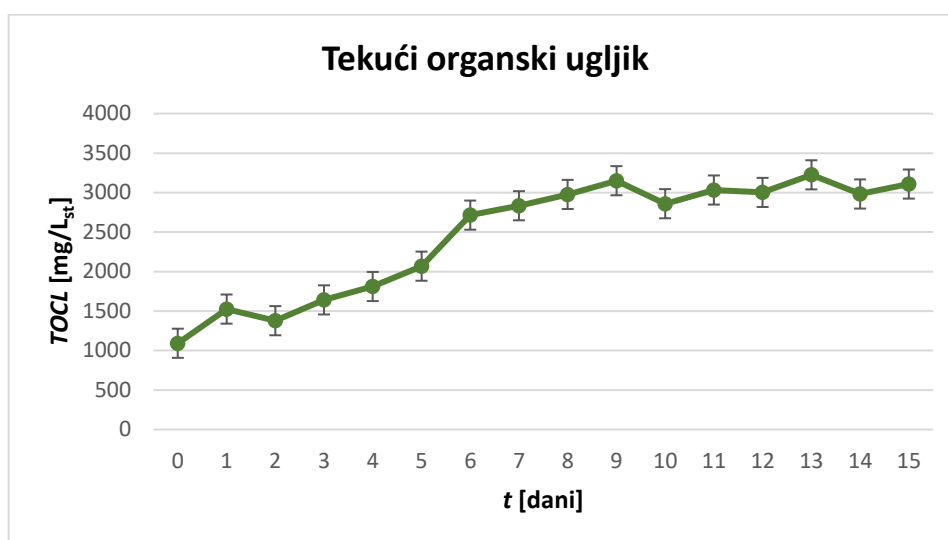
Temeljem ovih rezultata, postupak fermentacije bi se trebao zaustaviti nakon 6 dana kako radni organizam ne bi koristio nastale reducirajuće šećere. Tako dobiveni ekstrakt s najvećom koncentracijom reducirajućih šećera mogao bi se dalje koristiti u proizvodnji bioetanola ili nekih visoko vrijednih proizvoda (npr. mliječne kiseline), uz dodatno koncentriranje. Bioetanol se koristi se kao zamjena za fosilna goriva, što doprinosi smanjenju emisija stakleničkih plinova i održivijoj energetskej budućnosti. Mliječna kiselina je također visoko vrijedan proizvod koji se koristi kao konzervans, regulator kiselosti, a nalazi primjenu i u proizvodnji farmaceutskih i kemijskih proizvoda (Aliyu i Bala, 2023)



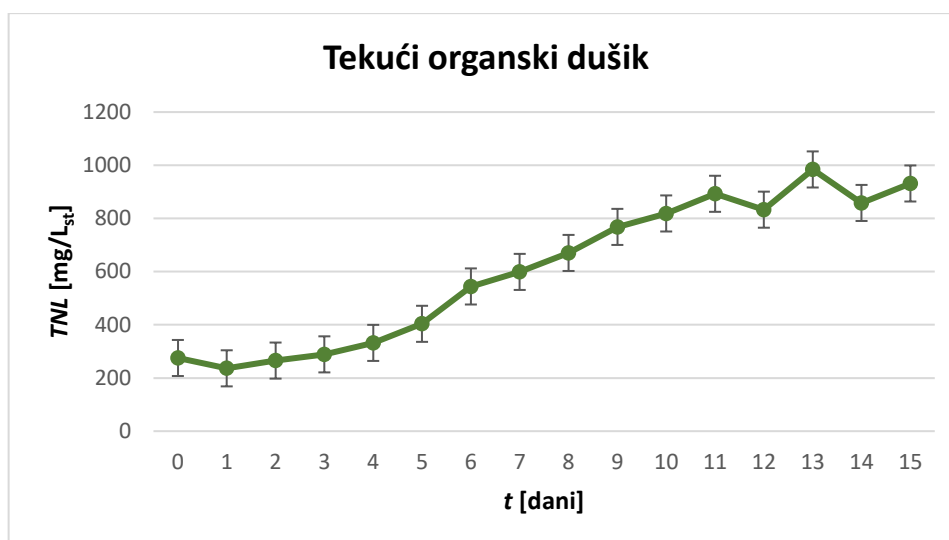
Slika 21 Grafički prikaz koncentracija ukupnih reducirajućih šećera tijekom 15 dana fermentacije

4.3.1. Određivanje koncentracije tekućeg ugljika i dušika

U početnom uzorku pivskog tropa prisutno je 1091,89 mg/L_{st} ukupnog tekućeg organskog ugljika te 275,17 mg/L_{st} ukupnog tekućeg dušika. Tijekom 15 dana fermentacije dolazi do porasta koncentracija ukupnog tekućeg organskog ugljika i tekućeg dušika (**Slika 22 i 23**). Maksimalna koncentracija ukupnog tekućeg organskog ugljika (3224,86 mg/L_{st}) i tekućeg dušika (984,24 mg/L_{st}) izmjerene su nakon 13. dana fermentacije. Koncentracija ukupnog tekućeg ugljika povećala se 2,95 puta, što dokazuje da nije došlo do razgradnje molekula koje sadrže ugljik, već do modifikacije materijala. Koncentracija tekućeg dušika porasla je 3,6 puta u odnosu na početne vrijednosti, što je posljedica rasta mikroorganizma.



Slika 22 Grafički prikaz koncentracija ukupnog tekućeg organskog ugljika tijekom 15 dana fermentacije



Slika 23 Grafički prikaz koncentracija ukupnog tekućeg dušika tijekom 15 dana fermentacije. Prema istraživanju Tišma i sur. (2018), prosječna vrijednost ukupnog organskog ugljika izmjerena u pivskom tropu prije fermentacije iznosila je 55,5 % suhe tvari, a nakon 14 dana obrade pivskog tropa zabilježena je degradacija ukupnog organskog ugljika od 10,5 %, što ukazuje na sposobnost *Trametes versicolor* u razgradnji organskih spojeva.

Prema Gmoser i sur. (2020), nakon 6. dana fermentacije na čvrstim nosačima pomoću *N. intermedia*, gdje je kao supstrat korišten kruh od kiselog tijesta, udio dušika iznosi 2%, a 2,7 % kada je kao supstrat korišten pivski trop. Kombinacijom ova dva supstrata, pri čemu je udio pivskog tropa bio 10%, udio dušika iznosio je 6%. Iako dodavanje pivskog tropa nije značajno povećalo udio dušika tijekom 10 dana fermentacije, njegova prisutnost uvelike je pridonijela teksturi i poboljšala je bioraspoloživost spojeva s dušikom potrebnih mikroorganizmu za uspješnu fermentaciju.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata eksperimentalnih istraživanja u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Tijekom 15 dana fermentacije zabilježen je gubitak mase supstrata od 25,32%.

pH vrijednost supstrata tijekom 15 dana fermentacije, varirala je u rasponu od 6,14 do 6,62.

Dokazana je mogućnost proizvodnje hidrolitičkih enzima β -glukozidaze, celulaze, ksilanaze i invertaze, pomoću gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pivskom tropu kao supstratu.

Izmjerene su visoke volumne i specifične aktivnosti ksilanaze i invertaze (ksilanaza, $t = 15$. dan: $V.A = 104,852 \pm 12,189$ U/mL i $S.A = 309,942 \pm 5,193$ U/mg; invertaza, $t = 14$. dan; $V.A = 331,858 \pm 18,744$ U/mL i $S.A. = 1033,840 \pm 71,361$ U/mg).

Izmjerene su niske volumne aktivnosti β -glukozidaze i celulaze (β -glukozidaza, $t = 15$. dan: $V.A = 2,239 \pm 0,217$ U/mL i $S.A = 6,226, \pm 0,208$ U/mg; celulaza, $t = 14$. dan; $V.A = 0,043 \pm 0,005$ FPU/mL i $S.A. = 0,384 \pm 0,052$ FPU/mg).

Nakon 6 dana fermentacije, došlo je do povećanja koncentracije ukupnih reducirajućih šećera za 3,4 puta u odnosu na početnu koncentraciju pri čemu je početna koncentracija ukupnih reducirajućih šećera iznosila $4,263 \text{ mg}_{\text{glukoze}}/\text{g}_{\text{st}}$, a maksimalna koncentracija nakon 6 dana $14,379 \text{ mg}_{\text{glukoze}}/\text{g}_{\text{st}}$. Nakon 15 dana fermentacije koncentracija ukupnih reducirajućih šećera iznosila je $12,410 \text{ mg}_{\text{glukoze}}/\text{g}_{\text{st}}$.

U početnom uzorku pivskog tropa izmjereno je $1091,89 \text{ mg}/\text{L}_{\text{st}}$ ukupnog tekućeg organskog ugljika i $275,17 \text{ mg}/\text{L}_{\text{st}}$ ukupnog tekućeg dušika. Tijekom fermentacije ove koncentracije su rasle, a maksimalne vrijednosti postignute su nakon 13. dana fermentacije u iznosu $3224,86 \text{ mg}/\text{L}_{\text{st}}$ tekućeg organskog ugljika i $984,24 \text{ mg}/\text{L}_{\text{st}}$ i tekućeg dušika.

6. LITERATURA

- Adney, B, and J Baker. "Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: 08/12/1996." Technical Report, 2008.
- Aliyu, Salihu, and Muntari Bala. "Brewer's Spent Grain: A Review of Its Potentials and Applications," African Journal of Biotechnology vol.10, 324-331, 2011.
- Andjelković, Uroš, Srdjan Pićurić, and Zoran Vujčić. "Purification and Characterisation of *Saccharomyces Cerevisiae* External Invertase Isoforms." Food Chemistry 120, no. 3: 799–804, 2010.
- 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.
- Bailey, Bryan A., Ronald F. Korcak, and James D. Anderson. "Alterations in *Nicotiana Tabacum* L. Cv Xanthi Cell Membrane Function Following Treatment with an Ethylene Biosynthesis-Inducing Endoxylanase." Plant Physiology 100, no. 2: 749–55, 1992.
- 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, Valášková 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.
- 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. Chandel, Anuj Kumar, Vijay Kumar Garlapati, Akhilesh Kumar Singh, Felipe Antonio Fernandes Antunes, and Silvio Silvério Da Silva. "The Path Forward for Lignocellulose Biorefineries: Bottlenecks, Solutions, and Perspective on Commercialization." Bioresource Technology 264: 370–81, 2018.
- 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.
- Desai, S. S., & Nityanand, C. Ligninolytic enzymes: a biotechnological perspective. In *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 155-169). Springer, 2011.

- Eliopoulos, C.; Arapoglou, D.; Choriantopoulos, N.; Markou, G.; Haroutounian, S.A. Conversion of brewers' spent grain into proteinaceous animal feed using solid state fermentation. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 29, 29562–29569, 2022.
- Fatma, Shabih, Amir Hameed, Muhammad Noman, Temoor Ahmed, Muhammad Shahid, Mohsin Tariq, Imran Sohail, and Romana Tabassum. "Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for the Future." *Protein and Peptide Letters* 25, no.2: 148–63, 2018.
- Gmoser, Rebecca, Rikard Fristedt, Karin Larsson, Ingrid Undeland, Mohammad Taherzadeh, and Patrik Lennartsson. "From Stale Bread and Brewers Spent Grain to a New Food Source Using Edible Filamentous Fungi." *Bioengineered* 11, 582–98, 2020.
- Hatakka, A. Biodegradation of Lignin. In *Microbial Degradation of Natural Products* (pp. 129–180). Springer, 2001.
- He, Qin, Huadong Peng, Mengyao Sheng, Shishan Hu, Jiguo Qiu, and Jiayu Gu. "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.
- 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.
- Kaur, Jaspreet, Amar Pal Singh, Ajeet Pal Singh, and Rajinderpal Kaur. "White-Rot Fungus: An Updated Review." *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*, September 30, 202–17, 2021.
- Kumar V, Ahluwalia V, Saran S, Kumar J, Patel, AK, Singhanian RR: Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: 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.
- Larios-Cruz, Ramón, Juan Buenroostro-Figueroa, Arely Prado-Barragán, Rosa M. Rodríguez-Jasso, Raúl Rodríguez-Herrera, Julio C. Montañez, and Cristóbal N. Aguilar. "Valorization of Grapefruit By-Products as Solid Support for Solid-State Fermentation to Produce Antioxidant Bioactive Extracts." *Waste and Biomass Valorization* 10, no. 4. 763–69, 2019.

- 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 agro40 industrial wastes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 27:100407, 2020.
- Lekounougou, S., M. Pétrissans, J. P. Jacquot, E. Gelhaye, and P. Gérardin. "Effect of Heat Treatment on Extracellular Enzymatic Activities Involved in Beech Wood Degradation by *Trametes Versicolor*." *Wood Science and Technology* 43, no. 3–4: 331–41, 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, Kieran M., Eric J. Steffen, and Elke K. Arendt. "Brewers' Spent Grain: A Review with an Emphasis on Food and Health." *Journal of the Institute of Brewing* 122, no. 4: 553–68, 2016.
- Machado, Angela S., Fernanda Valadares, Tatiane F. Silva, Adriane M. F. Milagres, Fernando Segato, and André Ferraz. "The 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* 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.
- Margetić, Aleksandra, and Zoran Vujčić. "Comparative Study of Stability of Soluble and Cell Wall Invertase from *Saccharomyces Cerevisiae*." *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 47, no. 3: 305–11, 2017.
- Mehta, Siddhi, Swarn Jha, and Hong Liang. "Lignocellulose Materials for Supercapacitor and Battery Electrodes: A Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 134: 110345, 2020.
- Menon, Vishnu, and Mala Rao. "Trends in Bioconversion of Lignocellulose: Biofuels, Platform Chemicals & Biorefinery Concept." *Progress in Energy and Combustion Science* 38, no. 4: 522–50, 2012.
- Miller GL: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):426–428, 1959.

- 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.
- 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.
- Pejin, D., et al. Valorization of brewer's spent grain as a source of renewable chemicals. *Industrial Crops and Products*, 50, 883-891, 2013.
- 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.
- Sigoillot, J. C., & Lesage-Meessen, L. Lignin-degrading enzymes from white-rot fungi. In *Industrial Applications (Vol. 2, pp. 3-25)*. Springer, 2003.
- Singh, Anita, Somvir Bajar, Arti Devi, and Deepak Pant. "An Overview on the Recent Developments in Fungal Cellulase Production and Their Industrial Applications." *Bioresource Technology Reports* 14: 100652, 2021.
- Soccol CR, Costa ES de F, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LP de S: Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1): 52–71, 2017.
- Subramaniyan, S., and P. Prema. "Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application." *Critical Reviews in Biotechnology* 22, no. 1: 33–64, 2002.
- Tavares, A. P. M., et al. Laccase activity and putative laccase genes in soil fungi. *Environmental Microbiology*, 7(1), 98-105, 2005.
- Tišma M, Bucić-Kojić A, Planinić M: Bio-based products from lignocellulosic waste biomass: A State of te Art. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Chem. Biochem. Eng.Q.* 35(2):139–156, 2021. (b).
- Tišma M, Znidaršić-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).
- Tišma, Marina, Anita Jurić, Ana Bucić-Kojić, Mario Panjičko, and Mirela Planinić. "Biovalorization of Brewers' Spent Grain for the Production of Laccase and Polyphenols: Biovalorization of Brewers' Spent Grain." *Journal of the Institute of Brewing* 124, no. 2, 182–86,2018.
- 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.
- Wong, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 174-209, 2009.
- Zeko-Pivač, Anđela, Anja Bošnjaković, Mirela Planinić, Jelena Parlov Vuković, Predrag Novak, Tomislav Jednačak, and Marina Tišma. "Improvement of the Nutraceutical Profile of Brewer's Spent Grain after Treatment with *Trametes versicolor*." *Microorganisms* 10, no. 11: 2295, 2022.
- Zeko-Pivač, Anđela, Marina Tišma, Polona Žnidaršič-Plazl, Biljana Kulisic, George Sakellaris, Jian Hao, and Mirela Planinić. "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.
- Zhang, Wen, Chenyang Diao, and Lei Wang. "Degradation of Lignin in Different Lignocellulosic Biomass by Steam Explosion Combined with Microbial Consortium Treatment." *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 16, no. 1. 2023.