

# Razvoj procesa biološke obrade bučine pogače u proizvodnji bioprodukata - koncept biorafinerije

---

Šibalić, Darijo

Doctoral thesis / Doktorski 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:109:817774>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-12**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Darijo Šibalić**

**RAZVOJ PROCESA BIOLOŠKE OBRADNE BUČINE POGAČE U  
PROIZVODNJI BIOPRODUKATA – KONCEPT BIORAFINERIJ**

**DOKTORSKI RAD**

Osijek, listopad, 2023.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DOKTORSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Doktorski studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam  
Smjer: Prehrambena tehnologija  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska  
UDK: 606:62 (043.3)

608.32:502.131.1 (043.3)

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

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

**Tema rada** je prihvaćena na VIII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 27. svibnja 2021. godine.

**Mentor:** prof. dr. sc. *Marina Tišma*

### RAZVOJ PROCESA BIOLOŠKE OBRADJE BUČINE POGAČE U PROIZVODNJI BIOPRODUKATA – KONCEPT BIORAFINERIJE

*Darijo Šibalić, 0113132584*

**Sažetak:** Glavni cilj doktorskog rada bio je razviti biološku metodu obrade bučine pogače uzgojem *Thermomyces lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (SSF) u svrhu proizvodnje enzima lipaza i bučine pogače unaprijeđene kvalitete. U prvom djelu istraživanja proveden je razvoj brzog spektrofotometrijskog testa za mjerenje početne reakcijske brzine hidrolize esterske veze pomoću lipaze iz *T. lanuginosus* (TLL) te je predložen Hillov kinetički model u svrhu procjene kinetičkih parametara hidrolize pNP-palmitata. Drugi dio istraživanja odnosio se na optimiranje uvjeta SSF procesa te je razvijen matematički model s mogućnošću predikcije proizvodnje lipaze. Nakon validacije matematičkog modela, provedena je karakterizacija lipaze. Dodatno, provedeno je uvećanje mjerila proizvodnje TLL provedbom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama. Proizvedena lipaza korištena je kao biokatalizator u reakciji hidrolize različitih vrsta ulja čime je potvrđena široka supstratna specifičnost proizvedene TLL. Štoviše, potvrđena je visoka učinkovitost djelomično pročišćene TLL u hidrolizi otpadnog suncokretovog ulja. SSF procesom poboljšana je kemijski sastav supstrata te je predložena mogućnost korištenja biološki obrađene pogače za proizvodnju hrane za životinje. U konačnici, potvrđena je održivost procesa proizvodnje enzima lipaze i bučine pogače unaprijeđene kvalitete, čime je zaokružen proces valorizacije lignocelulozne biomase, ostvaren "zero-waste" pristup i potvrđen predloženi koncept biorafinerije.

**Ključne riječi:** biorafinerija, fermentacija na čvrstim nosačima, *Thermomyces lanuginosus*, lipaza, procjena održivosti

**Rad sadrži:** 209 stranica  
48 slika  
35 tablica  
358 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Mirela Planinić</i>           | predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. <i>Ana Bucić-Kojić</i>           | član-mentor   |
| 3. dr. sc. <i>Gordana Šimić</i>                   | član          |
| 4. prof. dr. sc. <i>Daliborka Koceva Komlenić</i> | zamjena člana |
| 5. prof. dr. sc. <i>Sandra Budžaki</i>            | zamjena člana |

**Datum obrane:** 20. listopada 2023.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

PHD (DOCTORAL) THESIS

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Doctoral Study Food Technology and Nutrition**  
**Department of Process Engineering**  
**Subdepartment of Energy, Environment and Sustainable Development**  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia  
UDC: 606:62 (043.3)

608.32:502.131.1 (043.3)

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. VIII. held on 27 May 2021.

**Mentor:** *Marina Tišma*, PhD, full prof.

### DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL TREATMENT OF PUMPKIN OIL POMACE FOR THE PRODUCTION OF BIOPRODUCTS – BIOREFINERY APPROACH

*Darijo Šibalić*, 0113132584

**Summary:** The main objective of the Ph.D. research was to develop a biological method for processing pumpkin pomace by cultivating *Thermomyces lanuginosus* under solid-state fermentation conditions (SSF) to produce lipase and pumpkin pomace with improved quality. In the first part of the research, a rapid spectrophotometric assay was developed to measure the initial reaction rate of ester bond hydrolysis with lipase from *T. lanuginosus* (TLL), and Hill's kinetic model was proposed to estimate the kinetic parameters of pNP-palmitate hydrolysis. The second part of the research was concerned with the optimization of the conditions of the SSF process, and a mathematical model was developed to predict lipase production. After the validation of the mathematical model, the characterization of lipase was performed. In addition, TLL production was scaled up by performing the SSF process in the tray bioreactor. The produced lipase was used as a biocatalyst in the hydrolysis reaction of different types of oils, which confirmed the broad substrate specificity of the produced TLL. In addition, the high efficiency of the partially purified TLL in the hydrolysis of waste sunflower oil was confirmed. Moreover, the SSF process improved the chemical composition of the substrate and suggested the possibility of using the bioprocessed pomace to produce animal feed. Finally, the feasibility of the lipase and production of the pumpkin pomace with improved quality was confirmed, rounding out the valorization process of lignocellulosic biomass, achieving a "zero waste" approach, and validating the proposed biorefinery concept.

**Key words:** biorefinery, solid-state fermentation, *Thermomyces lanuginosus*, lipase, sustainability assessment

**Thesis contains:** 209 pages  
48 figures  
35 tables  
358 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. <i>Mirela Planinić</i> , PhD, full prof.           | chair person |
| 2. <i>Ana Bucić-Kojić</i> , PhD, full prof.           | supervisor   |
| 3. <i>Gordana Šimić</i> , PhD                         | member       |
| 4. <i>Daliborka Koceva Komlenić</i> , PhD, full prof. | stand-in     |
| 5. <i>Sandra Budžaki</i> , PhD, full prof.            | stand-in     |

**Defense date:** 20 October 2023

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

**Doktorski rad izrađen je u sklopu projekata financiranih od strane Hrvatske zaklade za znanost:**

*“Razvoj integriranog mikrosustava za biokatalitičku proizvodnju biodizela“*, voditelj prof. dr. sc. Bruno Zelić (Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu)

*“Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“*, voditelj prof. dr. sc. Marina Tišma (Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište u Osijeku)

**The doctoral thesis was completed as part of projects funded by the Croatian Science Foundation:**

*“Development of an integrated microsystem-based biocatalytic process for biodiesel production“*, head prof. Ph.D. Bruno Zelić (Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb)

*“Young Researchers' Career Development Project – Training New Doctoral Students“*, head prof. Ph.D. Marina Tišma (Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek)



*Ovom prilikom želim se zahvaliti mentorici prof. dr. sc. Marini Tišma na kompetentnim savjetima koje mi je dala tijekom izrade doktorskog rada. Također zahvaljujem svim članovima povjerenstva (bilo da se radi o obrani teme, ocjeni ili obrani doktorskog rada) na konstruktivnim smjernicama koje su pridonijele kvaliteti doktorskog rada.*

*Veliko hvala svim članovima nastavnog i nenastavnog osoblja Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek koji su izravno ili neizravno sudjelovali i pomogli u realizaciji eksperimentalnog dijela doktorskog rada.*

*Veliko hvala svim vanjskim suradnicima sa Sveučilišta u Zagrebu i Sveučilišta u Ljubljani koji su velikodušno podijelili svoje znanje i pridonijeli izvrsnosti u provođenju eksperimenata.*

*Hvala i mojim prijateljima kako u labosu tako i izvan fakulteta na pomoći tijekom vremena provedenog na Fakultetu.*

*Posebno i veliko hvala mojim roditeljima i sestrama koji su me neizmjereno i bezuvjetno podržavali!*

*I naravno, posebna posveta ovog doktorskog rada je mojoj supruzi, mom sinu i mojoj kćeri, koji su me cijelo vrijeme podržavali u izradi i obrani doktorskog rada. Ovo je za vas!*

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1. KONCEPT BIORAFINERIJE</b> .....	<b>6</b>
2.1.1. Podjela biorafinerija .....	7
2.1.1.1. Fizikalne metode obrade lignoceluloznog materijala .....	8
2.1.1.2. Kemijske i termokemijske metode obrade lignoceluloznog materijala .....	8
2.1.1.3. Biološke metode obrade lignoceluloznog materijala .....	10
2.1.2. Sustavni pregled i konverzija nusprodukata industrije hladno-prešanih ulja u visokovrijedne bioproducte .....	11
<b>2.2. FERMENTACIJA NA ČVRSTIM NOSAČIMA</b> .....	<b>14</b>
2.2.1. Utjecaj procesnih uvjeta na uspješnost provedbe fermentacije na čvrstim nosačima .....	17
2.2.1.1. Utjecaj udjela vode na proces fermentacije .....	18
2.2.1.2. Utjecaj karakteristika radnog mikroorganizma na proces fermentacije .....	19
2.2.1.3. Utjecaj karakteristika supstrata na proces fermentacije .....	20
2.2.1.4. Utjecaj temperature u procesu fermentacije .....	20
2.2.2. Kemijski sastav lignoceluloznih supstrata korištenih u provedbi fermentacije na čvrstim nosačima .....	21
2.2.2.1. Celuloza .....	22
2.2.2.2. Hemiceluloza .....	23
2.2.2.3. Lignin .....	24
2.2.2.4. Kemijski sastav supstrata iz industrije hladno prešanog ulja .....	25
2.2.3. Proizvodnja visokovrijednih produkata fermentacijom na čvrstim nosačima .....	27
2.2.4. Bioreaktori korišteni u provedbi fermentacije na čvrstim nosačima .....	32
2.2.4.1. Bioreaktor s pliticama .....	33
2.2.4.2. Bioreaktor s fiksnim slojem .....	34
2.2.4.3. Bioreaktor s pulsiranjem komprimiranog zraka .....	35
2.2.4.4. Bioreaktori s povremenim ili kontinuiranim miješanjem .....	35
<b>2.3. <i>Thermomyces lanuginosus</i></b> .....	<b>36</b>
2.3.1. Proizvodnja enzima uzgojem <i>Thermomyces lanuginosus</i> .....	37
2.3.2. Lipaza iz <i>Thermomyces lanuginosus</i> .....	37
2.3.3. Biotransformacije katalizirane lipazom .....	38
2.3.3.1. Enzimski katalizirana hidroliza esterske veze .....	39

2.3.3.2. Enzimski katalizirana sinteza jednostavnih estera .....	41
2.3.3.3. Enzimski katalizirana sinteza aromatskih estera .....	42
2.3.3.4. Enzimski katalizirana sinteza estera polifenola .....	42
2.3.3.5. Enzimski katalizirana sinteza estera ugljikohidrata .....	43
2.3.4. Metode pročišćavanja lipaze .....	44
2.3.4.1. Pročišćavanje lipaze precipitacijom pomoću soli .....	45
2.3.4.2. Pročišćavanje lipaze precipitacijom pomoću organskih otapala .....	46
<b>2.4. PROCJENA ODRŽIVOSTI BIOTEHNOLOŠKIH PROCESA .....</b>	<b>47</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1. ZADATAK .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>50</b>
3.2.1. Kemikalije .....	50
3.2.2. Uređaji .....	52
3.2.3. Razvoj brzog spektrofotometrijskog testa za mjerenje početne reakcijske brzine hidrolize esterske veze pomoću lipaze iz <i>T. lanuginosus</i> .....	53
3.2.3.1. Utjecaj početne koncentracije lipaze na hidrolitičku aktivnost .....	53
3.2.3.2. Određivanje molarnog ekstinkcijskog koeficijenta p-nitrofenola .....	54
3.2.3.3. Utjecaj početne koncentracije supstrata na aktivnost lipaze .....	55
3.2.3.4. Utjecaj pH na aktivnost lipaze .....	55
3.2.3.5. Utjecaj organskog otapala na aktivnost lipaze .....	55
3.2.3.6. Utjecaj dodatka različitih emulgatora na aktivnost lipaze .....	56
3.2.3.7. Procjena kinetičkih parametara hidrolize pNP-palmitata pomoću lipaze .....	56
3.2.3.8. Test za mjerenje hidrolitičke aktivnosti lipaze .....	57
3.2.4. Optimiranje procesa proizvodnje lipaze primjenom metode odzivnih površina .....	58
3.2.4.1. Supstrat .....	58
3.2.4.2. Radni mikroorganizam .....	58
3.2.4.3. Eksperimentalna matrica i optimiranje procesa proizvodnje lipaze .....	58
3.2.4.4. Proizvodnja lipaze u laboratorijskim staklenkama .....	59
3.2.4.5. Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom .....	60
3.2.4.6. Analiza udjela suhe tvari u uzorcima bučine pogače .....	61
3.2.4.7. Mjerenje pH supstrata .....	61
3.2.4.8. Mjerenje temperature supstrata tijekom fermentacije .....	61
3.2.5. Koncentriranje i pročišćavanje sirovog enzimskog pripravka kromatografskom metodom .....	62
3.2.6. Elektroforeza pročišćene lipaze .....	63



3.2.6.1. Priprema kemikalija za elektroforezu .....	63
3.2.6.2. Postupak provedbe elektroforeze .....	63
3.2.7. Karakterizacija nepročišćene lipaze .....	64
3.2.7.1. Ovisnost aktivnosti lipaze o temperaturi.....	64
3.2.7.2. Stabilnost lipaze tijekom inkubacije pri povišenoj temperaturi.....	65
3.2.7.3. Ovisnost aktivnosti lipaze o pH.....	65
3.2.7.4. Stabilnost lipaze tijekom skladištenja.....	65
3.2.7.5. Utjecaj organskog otapala na aktivnost lipaze .....	66
3.2.7.6. Utjecaj iona metala na aktivnost lipaze .....	66
3.2.8. Bioreaktor s pliticama.....	67
3.2.8.1. Priprema inokuluma za proces proizvodnje lipaze u bioreaktoru s pliticama .....	68
3.2.8.2. Uvećanje mjerila procesa biološke obrade bučine pogače u bioreaktoru s pliticama.....	69
3.2.9. Optimiranje biokatalitičke hidrolize jestivog ulja .....	70
3.2.9.1. Ekstrakcija i koncentriranje enzimskog ekstrakta liofilizacijom .....	70
3.2.9.2. Eksperimentalna matrica i optimiranje procesa biotransformacije suncokretovog ulja .....	71
3.2.9.3. Utjecaj temperature na hidrolizu ulja pomoću lipaze .....	73
3.2.9.4. Hidroliza različitih vrsta ulja pomoću sirovog enzimskog liofilizata .....	73
3.2.10. Djelomično pročišćavanje sirovog liofiliziranog enzimskog preparata.....	75
3.2.10.1. Pročišćavanje lipaze pomoću amonijeva sulfata .....	75
3.2.10.2. Pročišćavanje lipaze pomoću acetona.....	75
3.2.10.3. Pročišćavanje lipaze postupnom precipitacijom pomoću acetona.....	76
3.2.10.4. Hidroliza ulja katalizirana djelomično pročišćenom lipazom .....	77
3.2.10.5. Kemijska analiza frakcija dobivenih tijekom pročišćavanja sirovog liofiliziranog enzimskog preparata.....	77
3.2.11. Analiza kemijskog sastava bučine pogače .....	79
3.2.11.1. Provedba kruto-tekuće ekstrakcije u vodi .....	80
3.2.11.2. Provedba kruto-tekuće ekstrakcije u etanolu .....	80
3.2.11.3. Kvalitativna i kvantitativna analiza N-acetil-D-glukozamina i D-glukozamina....	80
3.2.11.4. Kvalitativna i kvantitativna analiza ergosterola .....	81
3.2.11.5. Određivanje masenog udjela slobodnih masti.....	82
3.2.11.6. Određivanje masenog udjela sirovih proteina po Kjeldahlu .....	83
3.2.11.7. Određivanje masenog udjela ukupnog ugljika u krutim uzorcima.....	83
3.2.11.8. Određivanje masenog udjela sirovih vlakana.....	83

3.2.11.9. Određivanje masenog udjela pepela.....	84
3.2.11.10. Određivanje masenog udjela reducirajućih šećera.....	84
3.2.11.11. Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih šećera UHPLC metodom.....	85
3.2.11.12. Određivanje masenog udjela proteina Bradfordičinom metodom .....	85
3.2.11.13. Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih polifenola UHPLC metodom	86
3.2.11.14. Određivanje masenog udjela ukupnih polifenola spektrofotometrijski .....	86
3.2.11.15. Određivanje masenog udjela ukupnih flavonoida spektrofotometrijski .....	87
3.2.11.16. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	87
3.2.11.17. Određivanje masenog udjela topivog ugljika i dušika .....	88
3.2.11.18. Analiza i procjena zdravstvene ispravnosti bučine pogače .....	88
3.2.12. Procjena održivosti procesa proizvodnje i pročišćavanja lipaze.....	92
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>93</b>
<b>4.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKI TEST ZA MJERENJE AKTIVNOSTI LIPAZE IZ <i>T. lanuginosus</i> .....</b>	<b>94</b>
4.1.1. Utjecaj koncentracije enzima na početnu reakcijsku brzinu.....	94
4.1.2. Ovisnost volumne aktivnosti lipaze o koncentraciji supstrata.....	95
4.1.3. Utjecaj pH na početnu reakcijsku brzinu .....	96
4.1.4. Utjecaj organskog otapala na aktivnost lipaze.....	96
4.1.5. Utjecaj emulgatora na aktivnost lipaze .....	99
4.1.6. Procjena kinetičkih parametara hidrolize pNP-palmitata pomoću lipaze.....	101
<b>4.2. OPTIMIZACIJA PROCESNIH UVJETA PROIZVODNJE LIPAZE VISOKE VOLUMNE AKTIVNOSTI .....</b>	<b>103</b>
4.2.1. Rezultati proizvodnje lipaze prema procesnim uvjetima definiranim u eksperimentalnoj matrici .....	103
4.2.2. Modeliranje i statistička optimizacija procesnih uvjeta proizvodnje lipaze.....	105
4.2.2.1. Utjecaj vremena fermentacije na proizvodnju lipaze .....	109
4.2.2.2. Utjecaj početne mase supstrata i početne vlažnosti supstrata na proizvodnju lipaze .....	109
4.2.2.3. Utjecaj temperature na proizvodnju lipaze .....	110
4.2.2.4. Promjena pH vrijednosti supstrata tijekom fermentacije.....	111
4.2.3. Pročišćavanje lipaze kromatografijom i elektroforeza lipaze.....	111
4.2.4. Karakterizacija nepročišćene lipaze .....	113
4.2.4.1. Ovisnost aktivnosti lipaze o temperaturi.....	114
4.2.4.2. Stabilnost lipaze tijekom inkubacije pri povišenoj temperaturi.....	115
4.2.4.3. Ovisnost aktivnosti lipaze o pH.....	115
4.2.4.4. Stabilnost lipaze tijekom skladištenja.....	115

4.2.4.5. Utjecaj organskih otapala na aktivnost lipaze .....	116
4.2.4.6. Utjecaj iona metala na aktivnost lipaze .....	116
<b>4.3. BIOLOŠKA OBRADA BUČINE POGAČE U BIOREAKTORU S PLITICAMA.....</b>	<b>117</b>
4.3.1. Utjecaj pripreme inokuluma na proizvodnju lipaze u bioreaktoru s pliticama .....	117
4.3.2. Uvećanje mjerila procesa biološke obrade bučine pogače u bioreaktoru s pliticama .....	121
4.3.2.1. Proizvodnja lipaze u bioreaktoru s pliticama .....	122
4.3.2.2. Promjena udjela vlage supstrata tijekom proizvodnje lipaze u bioreaktoru s pliticama.....	122
4.3.2.3. Promjena pH supstrata tijekom proizvodnje lipaze u bioreaktoru s pliticama ...	123
4.3.2.4. Mjerenje temperature supstrata tijekom proizvodnje lipaze u bioreaktoru s pliticama.....	123
<b>4.4. BIOTRANSFORMACIJA ULJA KATALIZIRANA POMOĆU LIPAZE.....</b>	<b>125</b>
4.4.1. Priprema i karakterizacija nepročišćenog liofiliziranog ekstrakta lipaze .....	125
4.4.2. Rezultati hidrolize ulja pomoću lipaze prema procesnim uvjetima definiranim u Box-Behnken eksperimentalnoj matrici .....	127
4.4.3. Modeliranje i statistička optimizacija procesnih uvjeta hidrolize ulja .....	128
4.4.3.1. Utjecaj temperature na hidrolizu ulja.....	132
4.4.3.2. Hidroliza različitih vrsta ulja pomoću sirovog liofiliziranog preparata lipaze .....	133
<b>4.5. REZULTATI DJELOMIČNOG PROČIŠĆAVANJA SIROVOG LIOFILIZIRANOG ENZIMSKOG PREPARATA .....</b>	<b>136</b>
4.5.1. Rezultati precipitacije lipaze pomoću amonijeva sulfata .....	136
4.5.2. Rezultati precipitacije lipaze pomoću acetona .....	138
4.5.3. Rezultati pročišćavanja lipaze postupnom precipitacijom pomoću acetona .....	140
4.5.4. Rezultati hidrolize ulja katalizirane pomoću djelomično pročišćene lipaze.....	143
4.5.5. Rezultati kemijske analize frakcija dobivenih tijekom pročišćavanja sirovog liofiliziranog enzimskog preparata.....	146
4.5.5.1. Kemijska analiza prve frakcije (precipitata).....	147
4.5.5.2. Kemijska analiza druge frakcije (koncentrata).....	151
<b>4.6. REZULTATI KEMIJSKE ANALIZE BUČINE POGAČE .....</b>	<b>153</b>
4.6.1. Rezultati analize masenog udjela <i>N</i> -acetil-D-glukozamina i D-glukozamina.....	153
4.6.2. Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize masenog udjela ergosterola .....	154
4.6.3. Rezultati određivanja masenog udjela slobodnih masti .....	155
4.6.4. Rezultati određivanja masenog udjela sirovih proteina po Kjeldahlu i ekstraktibilnih proteina po Bradfordu .....	156
4.6.5. Rezultati određivanja masenog udjela ukupnog ugljika u krutim uzorcima .....	158
4.6.6. Rezultati određivanja masenog udjela sirovih vlakana .....	159

4.6.7. Rezultati određivanja masenog udjela pepela .....	161
4.6.8. Rezultati određivanja masenog udjela reducirajućih i pojedinačnih šećera.....	162
4.6.9. Rezultati analize pojedinačnih polifenola UHPLC metodom .....	165
4.6.10. Rezultati određivanja masenog udjela ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti.....	167
4.6.11. Rezultati određivanja masenog udjela topivog organskog ugljika i topivog dušika	169
4.6.12. Rezultati analize i procjene zdravstvene ispravnosti bučine pogače.....	171
<b>4.7. REZULTATI PROCJENE ODRŽIVOSTI PROCESA PROIZVODNJE I PROČIŠĆAVANJA LIPAZE.....</b>	<b>177</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>182</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>186</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

$A_{440}$	apsorbancija izmjerena pri 440 nm [-]
$A_{510}$	apsorbancija izmjerena pri 510 nm [-]
$A_{540}$	apsorbancija izmjerena pri 540 nm [-]
$A_{595}$	apsorbancija izmjerena pri 595 nm [-]
$A_{765}$	apsorbancija izmjerena pri 765 nm [-]
$AA_{\text{trolox}}$	antioksidacijska aktivnosti uzorka izražena kao ekvivalent troloxa [ $\text{mg}_{\text{trolox}}/\text{g}_{\text{st}}$ ]
$A_{\text{DPPH}}$	apsorbancija DPPH otopine izmjerena pri 515 nm [-]
$A_{\text{DPPH,EK}}$	apsorbancija otopine DPPH• očitana nakon inkubacije uz dodatak ekstrakta pri 515 nm [-]
ANN	umjetne neuronske mrežne (engl. <i>Artificial Neural Network</i> )
$C_{\text{DNS}}$	maseni udio reducirajućih šećera izmjeren DNS metodom [ $\text{mg}/\text{g}_{\text{st}}$ ]
$C_{\text{ergosterol}}$	masena koncentracija ergosterola [ $\text{mg}/\text{g}_{\text{ulje}}$ ]
$C_{\text{polifenol}}$	maseni udio pojedinog polifenola [ $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{st}}$ ]
$C_s$	koncentracija supstrata [ $\text{mmol}/\text{dm}^3$ ]
$C_{\text{šećer}}$	maseni udio pojedinačnih šećera [ $\text{mg}/\text{g}_{\text{st}}$ ]
$C_{\text{TN}}$	maseni udio topivog dušika [ $\text{mg}/\text{g}_{\text{st}}$ ]
$C_{\text{TOC}}$	maseni udio topivog organskog ugljika [ $\text{mg}/\text{g}_{\text{st}}$ ]
$C_{\text{UF}}$	maseni udio ukupnih flavonoida [ $\text{mg}_{\text{KA}}/\text{g}_{\text{st}}$ ]
$C_{\text{UP}}$	maseni udio ukupnih polifenola [ $\text{mg}_{\text{GK}}/\text{g}_{\text{st}}$ ]
$d$	promjer kivete [1 cm]
$dA/dt$	promjena apsorbancije u vremenu [1/min]
$Df$	stupnjevi slobode
DMSO	dimetilsulfoksid
DPPH•	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
$\text{DPPH}^{\bullet}_{\text{inhibicija}}$	postotak inhibicije DPPH• [%]
$\epsilon$	molarni ekstinkcijski koeficijent [ $\text{dm}^3/(\text{mmol cm})$ ]
$f$	faktor za izračun udjela bjelančevina prema udjelu dušika [-]
$F$	stupanj pročišćavanja lipaze (engl. <i>fold</i> ) [-]
FR	faktor razrjeđenja [-]
$\gamma_{2,5\text{-anhidroman}}$	masena koncentracija 2,5-anhidromanoze [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]
$\gamma_{\text{Ac}}$	masena koncentracija octene kiseline [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]
$\gamma_{\text{DNS}}$	masena koncentracija reducirajućih šećera izmjerena DNS metodom [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ]
$\gamma_{\text{ergosterol}}$	masena koncentracija ergosterola [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ]
$\gamma_{\text{NAcGlc}}$	masena koncentracija <i>N</i> -acetil-D-glukozamina [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ]

$\gamma_{\text{polifenol}}$	masena koncentracija pojedinog polifenola [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ]
$\gamma_{\text{protein}}$	masena koncentracija proteina [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ]
$\gamma_{\text{šećer}}$	masena koncentracija pojedinačnih šećera [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ]
$\gamma_{\text{TN}}$	masena koncentracija topivog dušika
$\gamma_{\text{TOC}}$	masena koncentracija topivog organskog ugljika [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ]
$\gamma_{\text{trolox}}$	masena koncentracija troloxa [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ]
$\gamma_{\text{UF}}$	masena koncentracija ukupnih flavonoida [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ]
$\gamma_{\text{UP}}$	masena koncentracija ukupnih polifenola [ $\text{mg}/\text{cm}^3$ ]
$k$	broj varijabli
$k_d$	konstanta brzine deaktivacije lipaze [ $1/^\circ\text{C}$ ]
$K_m$	Michaelisova konstanta [ $\text{mmol}/\text{dm}^3$ ]
$K_{m,\text{app}}$	prividna vrijednost Michaelisove konstante [ $\text{mmol}/\text{dm}^3$ ]
$m_{2,5\text{-anhidroman}}$	masa 2,5-anhidromanoze [g]
$m_{\text{Ac}}$	masa octene kiseline [g]
$m_{\text{enzim}}$	masa sirovog liofiliziranog pripravka lipaze [g]
$m_{\text{hidrolizat}}$	masa hidrolizata korištenog za titraciju [g]
$M_{\text{NaOH}}$	molarnost korištenog natrijevog hidroksida za titraciju [ $\text{mmol}/\text{dm}^3$ ]
$m_{\text{pepeo}}$	masa pepela [g]
$m_{\text{pufer}}$	masa pufera u reakcijskoj smjesi [g]
$Mr_{2,5\text{-anhidroman}}$	relativna molekulska masa 2,5-anhidromanoze [162,14 g/mol]
$Mr_{\text{Ac}}$	relativna molekulska masa octene kiseline [60,052 g/mol]
$Mr_{\text{Glc}}$	relativna molekulska masa D-glukozamina [161 g/mol]
$Mr_{\text{N-AcGlc}}$	relativna molekulska masa N-acetil-D-glukozamina [203 g/mol]
$MS$	varijanca
$m_s$	masa supstrata [g]
$MSC$	kriterij odabira modela (engl. <i>model selection criterion</i> )
$m_{\text{ulje}}$	masa ulja [g]
$m_{\text{uz}}$	masa uzorka [g]
$MW_{\text{MK,SR}}$	prosječna molekulska masa masnih kiselina ulja [g/mol]
$n$	Hillov koeficijent [-]
$n_{\text{MD}}$	broj micelijskih diskova [-]
$N$	količina dušika [%]
$n_{2,5\text{-anhidroman}}$	množina 2,5-anhidromanoze [mol]
$n_{\text{Ac}}$	množina octene kiseline [mol]
PEG	polietilen glikol

$r$	brzina reakcije [U/cm <sup>3</sup> ]
$r_1$	volumna aktivnost lipaze [U/cm <sup>3</sup> ]
$R^2$	koeficijent determinacije
$r_2$	specifična aktivnost lipaze [U/mg <sub>protein</sub> ]
$r_3$	aktivnost lipaze preračunata je na masu suhe tvari [U/g <sub>st</sub> ]
$R_{Glc}$	ukupni iscrpak D-glukozamina iz hitina [0,920 g/g]
$R_{N-AcGlc}$	ukupni iscrpak N-acetil-D-glukozamina iz hitina [0,953 g/g]
RSM	metoda odzivnih površina (engl. <i>response surface methodology</i> )
SD	standardna devijacija
SDS	natrijev dodecil sulfat
SS	suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti
SSF	fermentacija na čvrstim nosačima (engl. <i>solid-state fermentation</i> )
$t_{1/2}$	vrijeme skladištenja za koje se aktivnost lipaze smanji za 50% [dani]
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometan
TLL	<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipaza
UHPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
$V$	volumen [cm <sup>3</sup> ]
$V_e$	volumen enzimskog preparata [cm <sup>3</sup> ]
$V_{eks}$	volumen ekstrakta [cm <sup>3</sup> ]
$V_m$	maksimalna brzina reakcije [U/cm <sup>3</sup> ]
$V_{MeOH}$	volumen metanola [cm <sup>3</sup> ]
$V_{NaOH}$	volumen utrošenog natrijevog hidroksida za titraciju [dm <sup>3</sup> ]
$V_u$	ukupni volumen uzorka u kiveti [cm <sup>3</sup> ]
$W_{ADF}$	maseni udio kiselih deterdžent vlakna [% <sub>st</sub> ]
$W_{ADL}$	maseni udio kiselog deterdženta lignina [% <sub>st</sub> ]
$W_{celuloza}$	maseni udio celuloze [% <sub>st</sub> ]
$W_{enzim}$	maseni udio enzima u reakcijskoj smjesi [%]
$W_{hemiceluloza}$	maseni udio hemiceluloze [% <sub>st</sub> ]
$W_{H2O}$	maseni udio vode [%]
$W_{IC}$	udio anorganskog ugljika [% <sub>st</sub> ]
$W_{lignin}$	masni udio lignina [% <sub>st</sub> ]
$W_{NDF}$	maseni udio neutralnih deterdžent vlakna [% <sub>st</sub> ]
$W_{pepeo}$	maseni udio pepela izražen na masu suhe tvari uzorka [% <sub>st</sub> ]
$W_{protein}$	maseni udio proteina izražen na suhu tvar uzorka [% <sub>st</sub> ]
$W_{st}$	maseni udio suhe tvari u uzorku [%]

$w_{TC}$	udio ukupnog ugljika [% <sub>st</sub> ]
$w_{TOC}$	udio ukupnog organskog ugljika [% <sub>st</sub> ]
$w_{ulje}$	maseni udio ulja izražen na masu suhe tvari uzorka [% <sub>st</sub> ]
$w_{ulje}$	maseni udio ulja u reakcijskoj smjesi [%]
$X_1$	masa supstrata [g]
$X_2$	udio inokuluma [-]
$X_3$	udio vlage [%]
$X_4$	vrijeme fermentacije [dani]
$X_5$	temperatura [°C]
$X_6$	maseni udio ulja [%]
$X_7$	maseni udio enzima [%]
$X_8$	pH [-]
$X_{hidroliza}$	konverzija triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina [%]
$X_{i,j}$	ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti)
$Y$	modelom predviđena odzivna funkcija
$Y_{Glc}$	prinos D-glukozamina [-]
$Y_{N-AcGlc}$	prinos N-acetil-D-glukozamina [-]
$\beta_0$	konstanta jednadžbe odzivnog polinoma
$\beta_{ij}$	koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma
$\beta_j$	koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
$\beta_{jj}$	koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma





## **1. UVOD**

Razvoj održivih industrijskih procesa i korištenje obnovljivih izvora energije posljedica su potrebe ali i obveze smanjenja stakleničkih plinova, budući da se Europa obvezala postati klimatski neutralan kontinent do 2050. godine (Thormann i sur., 2021). Gospodarstvo koje se temelji na korištenju obnovljivih prirodnih resursa u proizvodnom lancu naziva se održivo biogospodarstvo, čija načela pridonose provedbi 17 ciljeva održivog razvoja Ujedinjenih naroda (Gaffey i sur., 2023). Razvoj održivog gospodarstva zamjenom fosilnog ugljika s obnovljivim ugljikom iz lignocelulozne biomase, predmet su brojnih znanstvenih istraživanja (Manfred, 2020). Zemlje članice Europske unije (EU) proizvode 1 milijardu tona suhe tvari biomase godišnje. Više od dvije trećine biomase dolazi iz poljoprivrede, pri čemu je drvena biomasa iz šumarske industrije drugi najvažniji izvor biomase. Polovica ukupne biomase dostupne u EU, koja uključuje biomasu iz primarnih proizvodnih sustava (šumskih i biljnih ostataka) i sekundarnih izvora (poput recikliranja otpada i nusproizvoda šumske industrije) koristi se za proizvodnju hrane i stočne hrane. Od preostale biomase, 22% se koristi za proizvodnju energije, a 28% za proizvodnju materijala (Avitabile i sur., 2023). Povećana uporaba biomase u EU može pomoći u diversifikaciji opskrbe energijom u Europi, stvaranju radnih mjesta te smanjenju emisija stakleničkih plinova. Međutim, biomasu je potrebno proizvoditi, prerađivati i koristiti na održiv i učinkovit način kako se ne bi povećale emisije stakleničkih plinova i ugrozio ekosustav (European Commission, 2021). Integracija postojećih i razvoj novih tehnologija konverzije biomase u energiju i visokovrijedne proizvode, kao što su piroliza, kemijska hidroliza, enzimaska saharifikacija i fermentacija temelji su pokretanja biorafinerija (Cherubini, 2010; Nizami i sur., 2017; Ferreira i sur., 2018).

Bučina pogača je lignocelulozni nusproizvod prehrambene industrije koji nastaje proizvodnjom hladno prešanog bučinog ulja. Svake godine u svijetu se proizvede 27 milijuna tona bundeve. Bučine sjemenke i bučina pogača bogate su proteinima, aminokiselinama, vlaknima, biološki aktivnim spojevima (vitamin E, karotenoidi, fitosteroli, fenolne kiseline), mineralima i esencijalnim masnim kiselinama (Dotto i Chacha, 2020). Sukladno navedenom, bučina pogača predstavlja visoko vrijednu sirovinu za proizvodnju širokog spektra bioprodukata.

Jedan od načina valorizacije lignoceluloznog materijala je fermentacija na čvrstim nosačima (engl. *Solid-state fermentation*, SSF). Osnovna karakteristika SSF procesa je mali udio vode koja je prisutna u vezanom obliku za kemijske komponente supstrata i/ili je adsorbirana na površini supstrata. Ovisno o načinu provedbe, SSF se može koristiti za proizvodnju jestivih gljiva, mikrobnno-izmijenjene hranjive podloge te proizvodnju primarnih i/ili sekundarnih metabolita radnog mikroorganizma, kao što su alkoholi, masne kiseline, izoprenoidi, organske kiseline, fenolni spojevi, enzimi i drugi (Hasunuma i sur., 2013).

Najčešće korišteni supstrati u SSF procesima su lignocelulozni materijali iz prehrambene, poljoprivredne i šumarske industrije koji predstavljaju izvor makro- i mikroelemenata potrebnih za rast i razvoj radnog mikroorganizma (Kumar i Kanwar, 2012). Jednostavna tehnološka izvedba fermentora, mali utrošak energije, visok prinos, niska stopa proizvodnje efluenta, jednostavna separacija i operativna stabilnost željenog produkta samo su neki od prednosti SSF procesa za primjenu u biorafinerijama (Koyani i Rajput, 2015).

Cilj ovog doktorskog rada je razvoj procesa biološke obrade bučine pogače, lignoceluloznog nusproizvoda prehrambene industrije, za proizvodnju enzima lipaze uz istovremeno unaprjeđenje kvalitete bučine pogače. Potencijal razvijenog SSF procesa u ovom radu temelji se na principima biorafinerije s ciljem postizanja maksimalnog iskorištenja lignoceluloznog materijala i stvaranja koncepta bez akumulacije otpada ("zero-waste" koncept) (Sassner i sur., 2008; Escamilla-Alvarado i sur., 2016; Ubando i sur., 2019). U tu svrhu, pogača buče korištena je kao lignocelulozni supstrat za uzgoj termofilne, filamentozne gljive *Thermomyces lanuginosus*.

*T. lanuginosus* se često koristi za proizvodnju velikog broja termostabilnih enzima od znanstvenog i komercijalnog interesa kao što su  $\alpha$ -amilaza,  $\alpha$ -glukozidaza,  $\beta$ -glukozidaza, glukoamilaza, invertaza, maltaza, ksilanaza, pektinaza, fitaza, proteaza, aminopeptidaza i lipaza (Jensen i sur., 2002). Lipaza (triacilglicerol hidrolaza, EC 3.1.1.3) katalizira reakcije hidrolize, esterifikacije i transesterifikacije, a koristi se u farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj, tekstilnoj industriji te u proizvodnji biodizela (Pereira i sur., 2014). Upotreba enzima u industrijskim procesima zahtijeva visoku operativnu stabilnost, a često i stabilnost pri povišenim temperaturama. Prema literaturnim podacima, lipaza iz *T. lanuginosus* (TLL) je stabilna na visokim temperaturama i u širokom pH rasponu, u organskim otapalima, ionskim tekućinama i superkritičnim tekućinama, te pokazuje visok afinitet za različite supstrate (Lisboa i sur., 2014; Skjold-Jørgensen i sur., 2014; Han i sur., 2016).

U prvoj fazi istraživanja razvijen je brzi spektrofotometrijski test za mjerenje hidrolitičke aktivnosti komercijalne TLL. U tu svrhu, ispitan je utjecaj koncentracije enzima, koncentracije supstrata (pNP-palmitata), pH reakcijskog medija, utjecaj organskih otapala i emulgatora na hidrolitičku aktivnost TLL. Nakon definiranja optimalnih reakcijskih uvjeta, provedena je procjena kinetičkih parametara (maksimalne reakcijske brzine i Michaelisova konstanta) hidrolize pNP-palmitata.

Budući da na tijek SSF procesa utječe velik broj procesnih parametara, druga faza istraživanja usmjerena je na optimizaciju i matematičko modeliranje procesa proizvodnje lipaze iz *T. lanuginosus*. Ispitan je međusobni utjecaj pet nezavisnih varijabli (početna masa supstrata, udio inokuluma, udio vode, vrijeme i temperatura fermentacije) na proizvodnju TLL. Procjena utjecaja

navedenih parametara na proizvodnju TLL provedena je pomoću metode odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*, RSM) (Ebrahimpour i sur., 2008). Nakon optimizacije, ispitana je mogućnost uvećanja mjerila proizvodnje lipaze u bioreктору s pliticama.

Nadalje, provedena je karakterizacija nepročišćenog pripravka lipaze. Dodatno, provedeno je koncentriranje enzimskog ekstrakta liofilizacijom. Osnovna karakteristika lipaze kao biokatalizatora je mogućnost katalitičke hidrolize esterskih veza u molekuli triacilglicerola. Ovisno o svojstvima lipaze, moguća je potpuna ili djelomična biokatalitička hidroliza ulja za proizvodnju visokovrijednih spojeva kao što su esencijalne masne kiseline i funkcionalni monogliceridi (Morales-Medina i sur., 2018; Gunathilake i sur., 2021). Sukladno navedenom, ispitan je međusobni utjecaj tri nezavisne varijable (maseni udio ulja, maseni udio enzima i pH) na hidrolizu suncokretovog ulja. Eksperimentalna matrica definirana je prema Box-Behnken dizajnu, a procjena utjecaja navedenih parametara na hidrolizu ulja provedena je RSM metodom. Kako bi se istražila supstratna specifičnost proizvedene TLL, provedena je biokatalitička hidroliza različitih biljnih ulja kao modelnih supstrata (hladno prešano suncokretovo ulje, omegol ulje, hladno prešano ulje konoplje, ekstra djevičansko maslinovo ulje, djevičansko bučino ulje, hladno prešano laneno ulje, rafinirano kokosovo ulje) korištenjem reakcijskih uvjeta dobivenih nakon optimizacije. Kao što je gore spomenuto, sjemenke bundeve sadrže niz različitih ekstraktibilnih spojeva (Dotto i Chacha, 2020). Ekstrakcijom TLL iz biološki obrađene bučine pogače dolazi i do ekstrakcije drugih komponenti koje se također koncentriraju u procesu liofilizacije. Visoka koncentracija kontaminirajućih proteina u sirovom enzimskom pripravku može utjecati na stabilnost reakcijske smjese (emulzija ulje u vodi) tijekom hidrolize ulja (Adebar i sur., 2019). Prema tome, ispitana je mogućnost djelomičnog pročišćavanja TLL precipitacijom pomoću soli (amonijev sulfat) i organskog otapala (aceton). Hidrolitička aktivnost djelomično pročišćene TLL ispitana je u reakciji hidrolize različitih biljnih ulja i otpadnog suncokretovog ulja kako bi se proširio istraživački koncept iskorištavanja otpada u prehrambenoj industriji.

Tijekom SSF procesa dolazi do poboljšanja nutritivne vrijednosti supstrata. Prema tome, s ciljem postizanja „zero-waste“ koncepta (Abu Yazid i sur., 2017), provedena je kemijska analiza ostatka tijekom i nakon SSF procesa, kako bi se ispitaio potencijal primjene biološki obrađenog lignoceluloznog materijala u proizvodnji stočne hrane. U zadnjoj fazi istraživanja provedena je procjena održivosti predložene metode biološke obrade lignoceluloznog materijala (“Green Metrics”) (Roschangar i sur., 2015).

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. KONCEPT BIORAFINERIJE

U 21. stoljeću zaštita i odgovorno korištenje različitih resursa važne su političke zadaće u održivom gospodarskom razvoju. Održivi gospodarski razvoj podrazumijeva sigurnu i održivu industrijsku proizvodnju, pouzdan i dugoročan sustav ulaganja i financiranja, sigurnost okoliša i održive uvjete za život i rad u društvu. Svjetsko tržište ovisno je o neobnovljivim fosilnim resursima, budući da se oko 80% energije i 90% svih kemikalija proizvodi iz fosilnih izvora (Kamm i sur., 2006). Međutim, fosilni resursi ne smatraju se održivima i njihova je dugoročna dostupnost više nego upitna. Zbog rastućih troškova fosilnih sirovina pada i isplativost njihove eksploatacije. Stoga je potrebno tražiti alternativne resurse i načine njihova korištenja za proizvodnju energije i kemikalija.

Neki od alternativnih obnovljivih izvora koji se koriste za proizvodnju energije (vjetar, sunce, voda) ne mogu se koristiti kao sirovina za proizvodnju bioproizvoda u kemijskoj, farmaceutskoj i biotehnološkoj industriji (Demirbaş, 2006). U tu svrhu lignocelulozna biomasa je uvedena kao alternativna, obnovljiva i ekološki prihvatljiva sirovina, čija valorizacija omogućuje proizvodnju širokog spektra bioproizvoda. S ekonomskog gledišta, spaljivanje biomase nije najbolja strategija za gospodarenje biomasom jer uzrokuje veliku štetu okolišu, a također se ne obnavlja sva energija pohranjena u biomasi (Ullah i sur., 2015). Stoga, istraživanja iz biotehnološkog područja ima veliku ulogu i utjecaj u razvoju održivih industrija, pri čemu ključnu ulogu ima razvoj i stvaranje novih sinergija između bioloških, fizikalnih, kemijskih i tehničkih znanosti (Kamm i sur., 2006).

Kao posljedica navedenog, razvijen je koncept biorafinerije i definiran kao proces, infrastruktura ili skup (konzorcij) postrojenja koje integriraju različite procese za održivu konverziju biomase u širok raspon komercijalnih bioproizvoda (hrana, hrana za životinje, kemikalije) i bioenergije (Takkellapati i sur., 2018). Štoviše, valorizacija otpadne biomase važan je korak u korištenju obnovljivih resursa kao dio integriranog pristupa gospodarenju otpadom (Poveda-Giraldo i sur., 2021). Međutim, zbog fizikalno-kemijskih svojstava lignocelulozne biomase, potpuna konverzija svih komponenti biomase u visokovrijedne bioprodukte predstavlja izazov današnjice u ispunjavanju potpunog potencijala kružne bioekonomije na ekološki održiv i ekonomski učinkovit način. Razvoj suvremenih tehnologija i integracija postojećih tehnologija u infrastrukturu biorafinerija jedno je od mogućih rješenja za cjelovitu konverziju lignocelulozne biomase (Periyasamy i sur., 2022). Očita potreba za rješavanjem ovog problema ogleda se u sve većem broju biorafinerija u Europi, kao što je vidljivo pretraživanjem Pilots4U baze podataka (**Slika 1**) mapirajući postojeću i registriranu mrežu biogospodarstva u Europi (Pilots4U Bioeconomy Innovation Database).



**Slika 1.** Mreža infrastrukturnih postrojenja biogospodarstva u Europi (izvor: Pilots4U)

### 2.1.1. Podjela biorafinerija

Biorafinerije se mogu podijeliti u različite kategorije s obzirom na vrstu korištenih sirovina, vrstu dobivenih bioprodukata, proces konverzije i korištenu tehnologiju (konvencionalna, napredna itd.) (Clark i Deswarte, 2008). Prema složenosti, biorafinerije su grupirane u tri kategorije (Kamm i Kamm, 2004). U prvu kategoriju pripadaju biorafinerije koje imaju mogućnost valorizacije jedne sirovine u jedan primarni bioprodukt (npr. proizvodnja biodizela iz ulja). U drugu kategoriju pripadaju biorafinerije koje imaju mogućnost valorizacije jedne sirovine u više različitih bioprodukata (npr. proizvodnja derivata ugljikohidrata i bioetanola iz zrna žitarica). Biorafinerije treće kategorije su tzv. napredne biorafinerije koje različitim metodama konverzije različitih sirovina mogu proizvoditi široki spektar različitih bioprodukata.

Zbog svoje složenosti, biorafinerije 3. kategorije podijeljene su u četiri skupine: (1) biorafinerije koje koriste cijeli usjev kao sirovinu (npr. uzgoj žitarice u svrhu proizvodnje škroba koji se dalje koristi u proizvodnji glukoze i bioetanola, a zaostala slama obrađuje se u lignoceluloznoj biorafineriji), (2) zelena biorafinerija koja koristi travu, zelene usjeve ili biljke kao sirovinu, (3) lignocelulozna biorafinerija koji koristi lignoceluloznu biomasu kao sirovinu i (4) koncept biorafinerije s dvije platforme bioprodukata (primjerice proizvodnja šećera i sintetskog plina) (Clark i Deswarte, 2008; Gaffey i sur., 2023).

S obzirom na kemijski sastav korištene sirovine, biorafinerije se mogu dodatno podijeliti na tri kategorije: (1) biorafinerija triglicerida (npr. biljna ulja, životinjske masti, otpadna jestiva ulja i ulja od mikroalgi), (2) biorafinerija šećera i škroba (npr. šećerna repa, slatki sirak, šećerna trska,



pšenica, kukuruz, ječam) i (3) lignocelulozna biorafinerija (npr. drvo, slama, trava) (Octave i Thomas, 2009; Maity, 2015).

U konačnici, Međunarodna agencija za energiju (*International Energy Agency* (IEA)) razvila je sustav klasifikacije biorafinerija temeljen na sirovinama, platformi biorafinerije, proizvodima i procesima (de Jong i sur., 2012). Međutim, klasifikacija biorafinerija vrlo je sporno pitanje i uvelike ovisi o dostupnim tehnologijama pretvorbe biomase za proizvodnju niza bioproizvoda na različitim platformama (Cherubini i sur., 2009). Iz tog razloga, osnovne tehnike predobrade i konverzije lignoceluloznih supstrata temeljene na principima biorafinerije opisane su u sljedećim poglavljima.

#### 2.1.1.1. Fizikalne metode obrade lignoceluloznog materijala

Fizikalne metode najčešće se koriste kao primarna metoda predobrade i pripreme biomase za daljnje korake valorizacije te podrazumijeva metode poput sušenja, usitnjavanja i prosijavanja. Usitnjavanje je tehnika predobrade kojom se mehanički smanjuje veličina čestica biomase, čime se povećava njezina nasipna gustoća. Metode mljevenja biomase ovise o svojstvima materijala i mogu se provoditi pomoću različitih vrsta mlinova (kuglični mlin, mlin čekićar, mlin s valjcima, mlin s diskovima). Glavni nedostatak procesa mljevenja biomase je velika potrošnja energije, što utječe na operativne i investicijske troškove procesa (Agbor i sur., 2011). Istraživanja su pokazala da odabir odgovarajuće metode usitnjavanja kao predobrade biomase može pozitivno utjecati na saharifikaciju pomoću enzima s ciljem povećanja prinosa jednostavnih šećera (Hideno i sur., 2009).

Tijekom predtretmana biomase mikrovalnim zračenjem, komponente biomase apsorbiraju zračenje, molekule se pobuđuju na više energetske razine što rezultira pucanjem kemijskih veze u lignoceluloznoj strukturi. Zahvaljujući ovom procesu moguće je modificirati kemijsku strukturu celuloze. Osim toga, obrada mikrovalovima može povećati topljivost biomase u subkritičnoj vodi i poboljšati učinkovitost procesa proizvodnje biovodika (Irmak i sur., 2018).

#### 2.1.1.2. Kemijske i termokemijske metode obrade lignoceluloznog materijala

Najčešće korištena metoda u valorizaciji lignocelulozne biomase je kiselinna obrada. Kiseline ubrzavaju hidrolizu hemiceluloze i razgradnju topljivog lignina na jednostavnije građevne jedinice koji se mogu koristiti u proizvodnji širokog spektra bioprodukata (Poveda-Giraldo i sur., 2021). Predobrada kiselinom može se provesti razrijeđenom kiselinom na visokoj temperaturi (udio kiseline H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 – 2,5% w/w; procesna temperatura: 120 – 210 °C) ili koncentriranom kiselinom

na nižoj temperaturi (udio kiseline:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  65 – 86% w/v,  $\text{HCl}$  41% w/v,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85%, w/w; procesna temperatura: 30 – 60 °C) (Tu i Hallett, 2019). Međutim, kemijska hidroliza biomase može rezultirati sintezom nepoželjnih nusproizvoda kao što su furfural i hidroksimetilfurfural. Osim toga, uporaba kiselina zahtijeva korištenje opreme otporne na koroziju. Separacija i pročišćavanje dobivenog produkta zahtijeva dodatne procesne korake za uklanjanje potencijalno otrovnih kiselina i proizvoda koji mogu utjecati na ekonomičnost procesa (Alawad i Ibrahim, 2022).

Druga kemijska metoda koja se koristi u procesu valorizacije biomase tijekom delignifikacije, hidrolize hemiceluloze i redukcije kristalnih područja celuloze je uporaba različitih lužina ( $\text{KOH}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{NH}_3$  i  $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Rezultati provedenih istraživanja pokazali su da je primjena lužine prilikom predobrade lignoceluloznog materijala rezultirala povećanim prinosom šećera nakon enzimske hidrolize (Nargotra i sur., 2018) te prinosa biometana nakon anaerobne digestije (Rahman i sur., 2018).

Ostale kemijske metode koje se mogu koristiti u kombinaciji s povišenom temperaturom u procesu valorizacije biomase uključuju primjenu eutektičnih otapala, ozonolize, ionskih kapljevina i organskih otapala (Loow i sur., 2017; Mulakhudair i sur., 2017; Qasim i sur., 2021; Vaidya i sur., 2022).

Termokemijske metode konverzije biomase u tekuće gorivo uključuju izravno izgaranje, torefikaciju, hidrotermalno ukapljivanje, pirolizu i rasplinjavanje. U termokemijskim procesima biomasa se u kontroliranim uvjetima razgrađuje na krute, tekuće i plinovite frakcije (sintetski plin). Daljnjim katalitičkim tretmanom dobivaju se tekuća goriva, tzv. "*drop-in*" biogoriva. Jedna od najvažnijih značajki procesa termokemijske pretvorbe biomase je mogućnost korištenja bilo koje vrste biomase kao sirovine, za razliku od procesa biokemijske konverzije (Raheem i sur., 2015). Termokemijski procesi dijele se na niskotemperaturne procese (procesna temperatura < 300 °C), kao što su torefikacija i hidrotermalna karbonizacija, i visokotemperaturne procese (procesna temperatura >300 °C) koji uključuju procese kao što su rasplinjavanje, izgaranje i piroliza (Quereshi i sur., 2021).

Izgaranje biomase definira se kao skupina kemijskih reakcija koje uključuju sintezu ugljičnog dioksida i vode konverzijom ugljika i vodika posredstvom oksidacijskih reakcija. Izravno izgaranje biomase za proizvodnju energije općenito se provodi u temperaturnom rasponu od 1000 do 2000 °C u prisutnosti zraka. Međutim, glavni problem su emisije  $\text{NO}_x$ ,  $\text{CO}$  i  $\text{SO}_2$  i kontaminirajućih tvari povezane s tim procesima (Osman, 2020).

Torefikacija je endotermna metoda predobrade biomase, a uključuje reakcije isparavanja, polimerizacije i karbonizacije. Uglavnom se provodi na temperaturama između 200 i 300 °C i brzinama zagrijavanja ispod 50 °C/min u atmosferi bez kisika. Ovim postupkom biomasa se obrađuje kako bi se proizveo proizvod koji se zatim koristi kao prikladna zamjena za ugljen (Cahyanti i sur., 2020).

Hidrotermalno ukapljivanje je termokemijski proces kojim se učinkovito razgrađuje mokra ili suha lignocelulozna sirovina u tekuće gorivo (Guo i sur., 2015). Hidrotermalno ukapljivanje može se provesti neizravnim procesom u kojem se biomasa prvo pretvara u sintetski plin, nakon čega slijedi katalitička sinteza goriva (alkohola i alkana). Upotrebom protičkih otapala (kao što su voda, alkohol, fenol, ionske tekućine) moguća je izravna hidrotermalna konverzija biomase u tekuće gorivo što proces čini učinkovitijim (Gollakota i sur., 2018).

Piroliza se smatra jednom od najčešće primijenjenih termokemijskih metoda za razgradnju lignocelulozne biomase. Piroliza biomase provodi se endotermnim reakcijama bez prisutnosti kisika čime nastaju kruta, tekuća i plinovita biogoriva. Proces toplinske razgradnje biomase uključuje složene reakcije kao što su dehidracija, dekarboksilacija, hidrogenacija, izomerizacija, aromatizacija, depolimerizacija i karbonizacija (Perkins i sur., 2018). Katalitička piroliza biomase pomoću katalizatora (npr. Ni-CaO-C) omogućuje učinkovito provođenje procesa pirolize pri nižim temperaturama procesa, čime se biomasa prevodi u goriva s poboljšanim fizičkim i kemijskim svojstvima (primjerice biovodik) (Chai i sur., 2020).

Rasplinjavanje je proces pomoću kojega se provodi konverzija biomase u sintetski plin termokemijskim putem u četiri koraka: (1) zagrijavanje ili sušenje biomase (100 – 200 °C) kako bi se smanjio sadržaj vlage; (2) piroliza tj razgradnja lignoceluloznog materijala na čvrste i hlapljive komponente; (3) oksidacija ili djelomično izgaranje i (4) rasplinjavanje na temperaturi od preko 700 °C u smjesu plinova CO, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> i CH<sub>4</sub> (sintetski plin) (Thomson i sur., 2020).

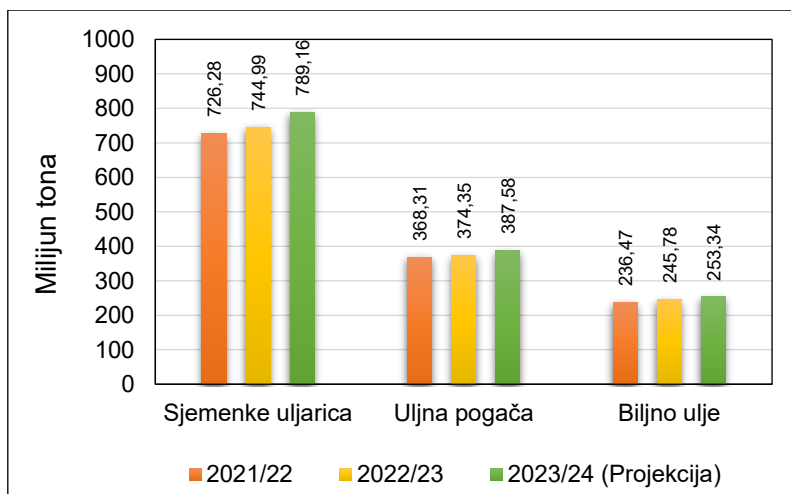
### 2.1.1.3. Biološke metode obrade lignoceluloznog materijala

U svrhu provedbe biološke konverzije biomase mogu se koristiti mikroorganizmi ili enzimi. U usporedbi s ostalim spomenutim metodama, biološku metodu karakterizira selektivnost u proizvodnji bioproizvoda, manji utrošak energije i ne zahtijeva upotrebu kemikalija. Osim toga, biološka obrada biomase je ekološki prihvatljiva metoda budući da tijekom njezine provedbe ne dolazi do akumulacije kemijskog otpada. Osnovni nedostaci biološke obrade biomase jeste dugotrajnost procesa, veličina procesne opreme i kompleksnost praćenja procesa (Sharma i sur.,

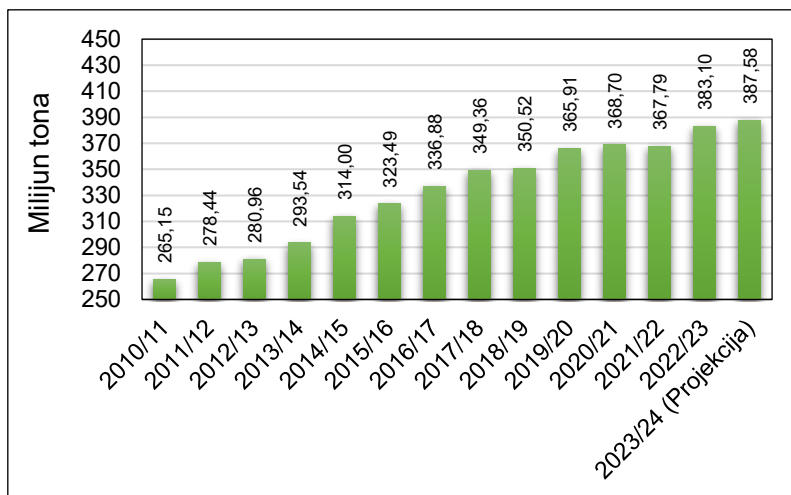
2019). Biološka konverzija lignocelulozne biomase, bilo da se radi o primjeni mikroorganizama kao živih stanica ili biokatalizatora poput enzima, uglavnom podrazumijeva hidrolizu komplekse lignocelulozne strukture na njihove građevne elemente. Međutim, prije provedbe biološke valorizacije biomase, potrebno je provesti određene korake predobrade lignoceluloznog materijala koji su obično energetske intenzivni procesi. Oko 40% ukupnih troškova odnosi se na predobradu biomase korištenu u proizvodnji jednostavnih ugljikohidrata i bioetanol (Gunasekaran i sur., 2021). Neki primjeri primjene enzimske obrade lignocelulozne biomase uključuju proizvodnju monosaharida za proizvodnju hrane ili kao izvora ugljika za mikrobnu konverziju (sinteza biogoriva i kemikalija), proizvodnju oligosaharida kao prebiotika, predobradu za poboljšanje ekstrakcije biljnih metabolita itd (Linares-Pasten i sur., 2014). Primjena mikroorganizama u svrhu konverzije ili predobrade biomase podrazumijeva provedbu procesa anaerobne digestije (proizvodnja biometana), alkoholne fermentacije (proizvodnja bioetanol) ili fermentacije na čvrstim nosačima (proizvodnja enzima, sekundarnih metabolita, šećera i drugih bioprodukata) (Paul i Dutta, 2018; Yafetto, 2022; David i sur., 2023).

### 2.1.2. Sustavni pregled i konverzija nusprodukata industrije hladno-prešanih ulja u visokovrijedne bioprodukte

U prošlosti, glavna svrha uzgoja uljarica bila je ekstrakcija ulja sadržanog u sjemenkama. U novije vrijeme uljarice se uzgajaju radi višestruke namjene (proizvodnja funkcionalnih biljnih ulja, stočne hrane, lijekova, biogoriva). Biljna ulja se također od davnina koriste u medicinske svrhe. Korištenje ulja kao što su kokosovo ulje, ulje cimeta, CBD ulje, ulje sjemenki pamuka, ulje sjemenki lana, ulje sezama, ulje soje, ulje orašastih plodova i maslinovo ulje potaknulo je interes za ljudsko zdravlje (Tarasiuk i sur., 2023). Tijekom proteklih 30 godina površine pod uljaricama porasle su za 82%, što je rezultiralo povećanjem ukupne svjetske proizvodnje uljarica od otprilike 240% (Rahman i de Jiménez, 2016). Najčešće uzgajane uljarice u svijetu su soja (60%) (*Glycine max*), uljana repica (*Brassica napus*), pamuk (*Gossypium hirsutum* L.), suncokret (*Helianthus annuus*) i kikiriki (*Arachis hypogaea*) (Gaonkar i Rosentrater, 2019). Prema podacima Ministarstva poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država (USDA) predikcija globalne proizvodnje uljarica (soja, uljana repica, palma) u 2024. godini iznosit će gotovo 790 milijun metričkih tona (**Slika 2**), te uljne pogače kao nusprodukta industrije ulja gotovo 388 milijun metričkih tona (**Slika 3**) (World Agricultural Supply and Demand Estimates, 2023).



**Slika 2.** Globalna proizvodnja uljarica, uljnih pogača i biljnog ulja (rezultati se odnose na uljarice: soja, uljana repica, palma) (izvor: World Agricultural Supply and Demand Estimates, WASDE – 637, USDA, Washington, DC)



**Slika 3.** Globalna proizvodnja uljnih pogača od 2010 godine (rezultati se odnose na uljarice: soja, uljana repica, palma) (izvor: World Agricultural Supply and Demand Estimates, WASDE – 637, USDA, Washington, DC)

Pri ekstrakciji ulja iz uljarica hladnim ili toplim prešanjem nastaju dvije frakcije: hladno prešano biljno ulje i uljna pogača ili sačma (komina). Uljna pogača je odmašćeni proteinski nusprodukt bogat vlaknima i mineralima i može se koristiti kao sirovina u raznim biorafinerijama. Prema prethodno prikazanim rezultatima na **Slici 2**, može se zaključiti da nakon proizvodnje ulja zaostaje gotovo 50% uljne pogače kao nusprodukta. Sukladno navedenom, prerada uljnih pogača u visokovrijedne proizvode temeljene na principima biorafinerije daje značajan doprinos smanjenju nakupljanja prehrambenog i poljoprivrednog otpada. U prethodnim poglavljima navedene su i

ukratko objašnjene metode konverzije biomase (Mirpoor i sur., 2021). U **Tablici 1** prikazani su procesi predobrade i obrade uljne pogače u bioproizvode (kao što su farmaceutici, enzimi, lipidi, antioksidansi, biopolimeri, hrana za životinje i biogorivo) korištenjem fizikalnih, kemijskih, termokemijskih i bioloških metoda u integriranom sustavu biorafinerije (Suganthi i sur., 2011; Mondala i sur., 2015; Thakur i sur., 2015; Leite i sur., 2016, 2019; Shashidhara i sur., 2017; Zhai i sur., 2019; Jathanna i sur., 2020; Yesmin i sur., 2020). S obzirom na količinu uljnih pogača koje se proizvode u cijelom svijetu i mogućnosti njihove upotrebe u proizvodnji širokog spektra bioproizvoda, potreba za razvojem biorafinerija s mogućnošću valorizacije pogače više je nego evidentna.

**Tablica 1.** Valorizacija uljnih pogača integriranjem različitih metoda biorafinerije u visokovrijedne bioprodukte

Supstrat	Predobrada	Obrada	Produkt
pogača soje pogača suncokreta	toplinska obrada (autoklaviranje)	SSF <i>B. licheniformis</i>	farmaceutici (bacitracin)
pogača kikirikija	toplinska obrada (autoklaviranje)	SSF <i>A. niger</i>	enzimi ( $\alpha$ -amilaza)
pogača soje	toplinska obrada (autoklaviranje)	SSF <i>A. niger</i>	enzimi (proteaza)
komina masline	ultrazvuk	SSF <i>A. niger</i>	enzimi (ksilanaza, celulaza)
<i>Pongamia</i>	hidroliza 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 75 °C, 30 min	SSF <i>A. ochraceus</i>	mikrobni lipidi
komina masline	toplinska obrada (autoklaviranje)	SSF <i>R. oryzae</i>	antioksidansi (polifenoli)
pogača soje	SSF <i>M. rouxii</i>	toplinska obrada (autoklaviranje)	biopolimeri (kitozan)
pogača lana	toplinska obrada (autoklaviranje)	SSF <i>A. niger</i>	hrana za životinje
pogača buče	saharifikacija $\alpha$ -amilaza	alkoholna fermentacija <i>S. cerevisiae</i>	biogorivo (bioetanol)
<i>Simarouba</i>	SSF <i>A. niger</i>	ekstrakcija ulja transesterifikacija	biogorivo (biodizel)
uljana repica	prešanje	anaerobna digestija	biogorivo (bioplin)

## 2.2. FERMENTACIJA NA ČVRSTIM NOSAČIMA

Fermentacija na čvrstim nosačima (SSF) odnosi se na metodu uzgoja mikroorganizama u mediju bez slobodne vode, odnosno s malim udjelom vode. U navedenom slučaju, čvrsti nosači predstavljaju izvor makro- i mikroelemenata potrebnih za rast i razvoj mikroorganizma. Najjednostavniji primjer navedene metode fermentacije je kompostiranje u prisutnosti prirodnih mikroorganizama (Ballardo i sur., 2017). SSF ima široku industrijsku primjenu uzgojem jedne ili više čistih kultura (Bechara i sur., 2011). Ovisno o načinu provedbe SSF se može koristiti za proizvodnju jestivih gljiva, za proizvodnju mikrobno-izmijenjene hranjive podloge ili za proizvodnju primarnih i/ili sekundarnih metabolita korištenog mikroorganizma. Primjeri SSF procesa u industrijskim razmjerima uključuju proizvodnju soja umaka i drugih tradicionalnih fermentiranih proizvoda kao što su sir i kruh (Abbas i sur., 2013; Juodeikiene i sur., 2013). Nadalje, SSF se koristi za proizvodnju enzima te spora za proizvodnju plavog sira s plemenitom pljesni (britanski Stilton, francuski Roquefort, talijanska Gorgonzola) (Money, 2016).

Jedan od glavnih izazova u razvoju SSF procesa je kontrola velikog broja parametara (npr. fluktuacija pH supstrata i akumulacija topline u bioreaktoru) kao i složenost izolacije i pročišćavanja produkta. Osim sinteze velikog broja sekundarnih metabolita radnog mikroorganizma tijekom fermentacije, provedbom SSF procesa na lignoceluloznim supstratima dolazi do sinteze drugih kontaminirajućih produkata iz supstrata (različiti produkti razgradnje kompleksne lignocelulozne strukture). Međutim, primjena SSF procesa u centru je velikog broja istraživanja kao glavnog načina provedbe fermentacije zbog dostupnosti različitih lignoceluloznih materijala koji se mogu koristiti kao supstrat za uzgoj mikroorganizama u svrhu proizvodnje jednog ili više visokovrijednih bioprodukata. Za razliku od SSF procesa, submerzni uzgoj (SmF) podrazumijeva rast mikroorganizma u tekućoj hranjivoj podlozi. Uzgoj mikroorganizama u SSF uvjetima ima velikih prednosti u odnosu na SmF proces (Koyani i Rajput, 2015). Osnovne karakteristike SSF i SmF procesa prikazani su u **Tablici 2** (Castilho i sur., 2000; Hölker i sur., 2004; Singhanian i sur., 2009; Kim i sur., 2011; Chen, 2013).

**Tablica 2.** Osnovne karakteristike uzgoja mikroorganizama na čvrstim nosačima i u submerznim uvjetima

Parametar	SSF	SmF
Supstrat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Udio vode od 13% do 80%. Nema slobodne vode.</li> <li>• Kemijski sastav hranjive podloge kompleksan, heterogen i promjenjiv.</li> <li>• Dostupni i jeftini supstrati prirodnog porijekla.</li> <li>• Hranjivu podlogu čine tri faze: plin, tekućina i krutina (plinska faza kontinuirana).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Udio vode &gt;95%. Slobodna voda čini veći udio hranjive podloge.</li> <li>• Proizvodnja homogene hranjive podloge primjenom kemikalija visoke čistoće.</li> <li>• Visoka cijena hranjive podloge.</li> <li>• Mediji čini jedna faza: tekućina koja je ujedno i kontinuirana faza</li> </ul>
Karakteristike uzgoja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simulacija uvjeta uzgoja gljiva i kvasaca u prirodnom okruženju.</li> <li>• Radni mikroorganizmi apsorbiraju nutrijente iz krutog supstrata (moguće stvaranja gradijenta koncentracije nutrijenata u supstratu).</li> <li>• Udio inokuluma čini 10% početne mase.</li> <li>• U aerobnim uvjetima, mikroorganizmi koriste kisik iz zraka.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Moguć uzgoj gljiva i kvasaca ali u prvom redu namijenjen uzgoju bakterija.</li> <li>• Radni mikroorganizmi apsorbiraju nutrijente iz tekuće hranjive podloge (nema mogućnosti stvaranja gradijenta koncentracije nutrijenata u supstratu).</li> <li>• Udio inokuluma čini manje od 10% početne mase.</li> <li>• U aerobnim uvjetima, mikroorganizmi koriste otopljeni kisik iz hranjive podloge (potrošnja energije u svrhu zasićenja hranjive podloge kisikom).</li> </ul>
Kontrola procesa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Složena kontrola procesnih uvjeta (npr. pH supstrata, temperatura supstrata i okolnog zraka, udio vlage supstrata i okolnog zraka).</li> <li>• Akumulacija topline tijekom fermentacije unutar sloja supstrata i unutar bioreaktora.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jednostavnija kontrola procesnih uvjeta.</li> <li>• Jednostavnije miješanje sadržaja bioreaktora čime su osigurani homogeni uvjeti medija te isključena mogućnost stvaranja gradijenata u koncentracijama supstrata, produkta, temperature i sl.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Miješanje hranjive podloge otežano, a rast mikroorganizama ograničen je difuzijom hranjivih tvari.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Miješanje hranjive podloge olakšano čime rast mikroorganizama nije ograničen difuzijom hranjivih tvari.</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Miješanje hranjive podloge rezultira mehaničkim oštećenjem biomase.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manja mogućnost mehaničkog oštećenja biomase uslijed miješanja hranjive podloge.</li> </ul>
Karakteristike produkta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produkti dobiveni tijekom SSF procesa imaju bolja svojstva nego proizvedeni SmF procesom (npr. Spore mikroorganizama otpornije na dehidraciju, veća operativna stabilnost proizvedenih enzima).</li> <li>• Kompleksni postupci izolacije i pročišćavanja željenog produkta.</li> <li>• Velika produktivnost procesa.</li> <li>• Nemogućnost odvajanja biomase radnog mikroorganizma od hranjive podloge (biomasa adsorbirana na krute čestice supstrata).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preferirani način proizvodnje farmaceutika (primjerice penicilina).</li> <li>• Veći stupanj čistoće produkta.</li> <li>• Mala produktivnost procesa.</li> <li>• Jednostavnija proizvodnja i separacija mikrobne biomase od hranjive podloge.</li> </ul>
Potrošnja vode	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manja potrošnja vode i manja akumulacija otpadne vode.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Velika količina vode zahtjeva procese obrade i zbrinjavanja otpadne vode.</li> </ul>
Sterilnost	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manja mogućnost kontaminacije.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Velika mogućnost kontaminacije zbog većeg aktiviteta vode.</li> </ul>

Izbor metode uzgoja mikroorganizama uglavnom ovisi o željenom proizvodu. Kod uzgoja gljiva mogu se koristiti oba načina uzgoja, ovisno o željenom proizvodu. SSF metoda koristi se za uzgoj jestivih i ljekovitih gljiva, dok se SmF metoda uglavnom koristi za uzgoj micelija gljiva. Kim i sur. (2011) proveli su istraživanje proizvodnje micelija *Agaricus bisporus* u SmF industrijskim uvjetima s ciljem proizvodnje zamjene za mljeveno meso. Na temelju dobivenih rezultata razvijen je ekonomski isplativ biotehnološki postupak za proizvodnju micelija iz jestivih gljiva i njegovu implementaciju u tehnologiju proizvodnje nadomjestaka za meso. Osim toga, proizvod dobiven primjenom micelija *A. bisporus* imao je bolja tehnološka i organoleptička svojstva od proizvoda dobivenog korištenjem soje kao glavnog i najčešće korištenog izvora proteina.

Uzgoj gljive *Pleurotus dryinus* IBB 903 u SmF uvjetima dovodi do proizvodnje različitih hidrolitičkih (celulaza i ksilanaza) i lignolitičkih (lakaza i mangan peroksidaza) enzima. Međutim, rezultati istraživanja provedenog od Elisashvili i sur. (2006) pokazali su superiornost dodatka lignoceluloznih supstrata (od 1% do 6% u hranjivu podlogu) u svrhu poboljšane proizvodnje lignolitičkih enzima (mangan peroksidaza) usporedno s eksperimentima provedenih primjenom sintetskih hranjivih podloga koje sadrže različite izvore ugljika.

Castilho i sur. (2000) proveli su komparativnu ekonomsku analizu proizvodnje lipaze pomoću *Penicillium restrictum* na čvrstim nosačima (SSF) i submerznom uzgoju (SmF). Prema rezultatima, kapitalna investicija za proizvodnju lipaze veća je za 78% primjenom SmF procesa u usporedbi s SSF procesnim uvjetima. Osim toga, cijena lipaze proizvedene SmF postupkom je 68% viša od maloprodajne cijene proizvoda. Cijena supstrata imala je najveći utjecaj na isplativost cjelokupnog procesa proizvodnje lipaze.

Biolška obrada dostupnog i jeftinog supstrata temeljena principima bio-rafinerije dodatno doprinosi značaju SSF procesu kroz iskorištavanje otpada prehrambene i poljoprivredne industrije. Samim time, SSF proces ima velik doprinos u gospodarenju otpadom. Međutim, utjecaj SSF i SmF procesa na okoliš potrebno je detaljno analizirati procjenom životnog ciklusa (engl. *Life cycle assessment*) svih procesa i procesnih struja uključenih tijekom provedbe navedenih procesa (Osman i sur., 2021). Bez obzira na navedene činjenice, SSF i SmF predstavljaju dva različita načina uzgoja mikroorganizama te svaki od njih ima određene prednosti kao i nedostatke zbog čega ih uglavnom nije jednostavno usporediti.

### **2.2.1. Utjecaj procesnih uvjeta na uspješnost provedbe fermentacije na čvrstim nosačima**

Na SSF proces utječe veliki broj parametara kao što su odabir mikroorganizma i supstrata (izvor ugljika, izvor dušika, omjer ugljika i dušika, udio makro- i mikro-elemenata), priprema i/ili pred-obrađivanje supstrata (kemijske i/ili fizikalne modifikacije), veličina čestica supstrata, visina sloja supstrata, pH vrijednost supstrata, udio vode i aktivitet vode ( $a_w$ ), relativna vlažnost supstrata i okolnog zraka, temperatura, oslobađanje topline tijekom respiracije mikroorganizma, vrsta i udio inokuluma, vrijeme fermentacije, udio plinova u okolnom zraku (promjena koncentracije kisika i ugljikovog dioksida) te vrsta bio-reaktora (fermentora) (Kumar i Kanwar, 2012). Prema tome, definiranje optimalnih SSF procesnih parametara s ciljem povećanja prinosa fermentacije i/ili smanjenja proizvodnih troškova zahtjeva kontrolu velikog broja parametara.

Matematički i statistički alati kao što je metoda odzivnih površina (RSM) često se koriste za optimizaciju i modeliranje procesnih parametara SSF procesa (Ebrahimpour i sur., 2008; Breig i Luti, 2021). RSM predstavlja skup matematičkih i statističkih alata koji se koriste za modeliranje i analizu utjecaja nezavisnih varijabli (faktora, parametara procesa) na promatrani odziv kroz regresijsku analizu eksperimentalnih podataka s ciljem poboljšanja, dorade i optimizacije procesa. (Bezerra i sur., 2008).

Osnovni koraci u primjeni RSM metode optimizacije procesnih parametara su: (i) Odabir nezavisnih varijabli (parametara) koje utječu na promatrani proces i definiranje ispitnog područja (razine) promatranih varijabli; (ii) Kodiranje razina promatranih varijabli; (iii) Odabir i kreiranje eksperimentalne matrice (Box–Behnken dizajn, središnji kompozitni dizajn i Doehlert dizajn); (iv) Provođenje eksperimenata prema eksperimentalnoj matrici; (v) Matematičko-statistička obrada eksperimentalnih podataka (aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom: linearni, dvofaktorijalni, kvadratni i kubični model); (vi) Evaluacija prikladnosti modela (ANOVA); (vii) Kreiranje odzivne površine (simulacija međusobnog utjecaja nezavisnih varijabli na odaziv); (viii) Numerička ili grafička procjena optimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli; (ix) Evaluacija dobivenog statističkog modela (Bezerra i sur., 2008; Tarley i sur., 2009; Bezerra i sur., 2019).

Zbog prethodno navedenih razloga i složenosti implementacije SSF metode, u sljedećim poglavljima ukratko je opisan utjecaj različitih čimbenika koji značajno utječu na uzgoj mikroorganizama na čvrstim nosačima.

#### 2.2.1.1. Utjecaj udjela vode na proces fermentacije

Osnovna karakteristika SSF procesa je mali udio vode koja je prisutna u vezanom obliku za kemijske komponente supstrata ili adsorbirana na površini supstrata. Udio vode i aktivitet vode ( $a_w$ ) utječe na razvoj micelija, proizvodnju spora i produkciju sekundarnih metabolita radnog mikroorganizma. Općenito, bakterije za pravilan rast i metaboličku aktivnost trebaju  $a_w$  od 0,90 – 0,99; za kvasce  $a_w$  vrijednost iznosi 0,80 – 0,90, a za gljive 0,60 – 0,70 (Chen, 2013). Udio vode tijekom SSF predstavlja zavisnu varijablu početnog udjela vode, udjela vode koja nastaje tijekom respiracije mikroorganizma, smanjenja udjela tijekom isparavanja vode, smanjenja udjela vode tijekom hidrolize kompleksnih komponenti supstrata (npr. hidroliza polisaharida) te smanjenja udjela vode tijekom sinteze biomase (Nagel i sur., 2000a). Sa stajališta prijenosa mase, voda adsorbirana na površini supstrata predstavlja stacionarnu fazu u kojoj se otapaju nutrijenti potrebni za rast mikroorganizama. Stoga je tijekom SSF procesa moguće formiranje koncentracijskog gradijenta vode i potrebnih hranjivih tvari u supstratu (Zhang i sur., 2017). S mikroskopskog gledišta, rast mikroorganizama na čvrstom supstratu ograničen je površinskom napetosti vode, pa se rast mikroba uglavnom odvija u porama supstrata (Chen, 2013).

### 2.2.1.2. Utjecaj karakteristika radnog mikroorganizma na proces fermentacije

Mikroorganizmi koji se koriste u procesu SSF moraju imati određena svojstva, kao što je sposobnost iskorištavanja polisaharida kao izvora ugljika, osobito netopljivih neškrobnih polisaharida (celuloza i hemiceluloza); sposobnost produkcije kompleksnog enzimskog sustava; mogućnost prodiranja u matriks čvrstog supstrata; otpornost na patogene mikroorganizme; i rast u uvjetima s malim udjelom vode (Chen, 2013). Tijekom definiranja procesnih uvjeta fermentacije, odabir odgovarajućeg mikroorganizma od ključne je važnosti ne samo za postizanje visokog prinosa željenog produkta, već i zbog činjenice da tijekom fermentacije radni mikroorganizam producira veliki broj primarnih i sekundarnih metabolita koji mogu utjecati na tijek fermentacije. Primjerice proizvodnja lipaze pomoću *Penicillium simplicissimum*. Tijekom fermentacije *P. simplicissimum* osim lipaze producira i enzim proteazu koja potencijalno može utjecati na inhibiciju lipaze. Optimiziranjem uvjeta procesa fermentacije i odabirom odgovarajućeg supstrata može se osigurati sinteza željenog produkta uz minimalne neželjene učinke proteaze (Di Luccio i sur., 2004).

Proces fermentacije može se provoditi uzgojem više različitih kultura ili primjenom prirodno prisutnih mikroorganizama na korištenom lignoceluloznom materijalu. Međutim, takve je procese teže kontrolirati nego kad se za fermentaciju koristi jedna čista kultura. Iz tog razloga potrebno je sterilizirati supstrat prije inokulacije. Proces sterilizacije supstrata često predstavlja "usko grlo" u procesu fermentacije jer može imati negativan utjecaj na ekonomičnost procesa. U suprotnosti, termička predobrada lignoceluloznog supstrata prije inokulacije može imati pozitivan učinak na produktivnost procesa i uzgoj radnog mikroorganizma u smislu otpuštanja i otapanja jednostavnih komponenti uslijed povišene temperature (kao što su šećeri i aminokiseline) koje mikroorganizmi koriste za rast (Chen, 2013).

Tijek fermentacije ovisi i o načinu inokulacije supstrata kao i o udjelu inokuluma. Veći udio inokuluma skraćuje *lag* fazu SSF procesa te je za očekivati da će se maksimalni prinos SSF procesa postići u kraćem vremenu. Međutim, istraživanja su pokazala da s većim udjelom inokuluma SSF proces ide u smjeru veće sinteze biomase što i ne znači nužno veću produktivnost SSF procesa u smislu veće sinteze željenih metabolita (npr. enzima) (Adinarayana i sur., 2003).

### 2.2.1.3. Utjecaj karakteristika supstrata na proces fermentacije

Na uspješnost provedbe SSF utječu različiti čimbenici čija je kontrola iznimno važna za postizanje visoke učinkovitosti fermentacije. Prije svega, odabir prikladnog supstrata za uspješnu implementaciju SSF procesa ovisi o nizu čimbenika (kemijski sastav kao i cijena i dostupnost supstrata). Čvrsti supstrat ne samo da služi kao nosač za pričvršćivanje mikroorganizama tijekom SSF procesa, već osigurava izvor ugljika i dušika, faktore rasta i druge hranjive tvari neophodne mikroorganizmu. Nadalje, prilikom odabira supstrata za SSF proces potrebno je provesti selekciju supstrata tako da njegova upotreba rezultira maksimalnom proizvodnjom željenog produkta. Na primjer, upotrebom supstrata u SSF procesu koji sadrži određeni udio lipida (uljne pogače) rezultira većom produkcijom lipaze (Damaso i sur., 2008).

Nadalje, veličina čestica supstrata direktno utječe na tijek SSF procesa. Veće čestice supstrata omogućuju adekvatnu opskrbu kisikom. U suprotnosti, manje čestice supstrata omogućuju veću dodirnu površinu s mikroorganizmom, a samim time i s hranjivim tvarima. Međutim, dodatkom vode, u pravilu, dolazi do stvaranja aglomerata čestica supstrata što dovodi do usporavanja i/ili inhibicije fermentacije zbog neadekvatne poroznosti supstrata (onemogućeno prodiranje hifa gljiva u unutrašnjost čvrstog supstrata) te otežane izmjene plinova (kisik i ugljikov dioksid) i energije (akumulacija metaboličke energije). Stoga, odgovarajuća veličina čestica neophodna je za rast micelija i adekvatnu opskrbu kisikom i hranjivim tvarima (Chen, 2013).

### 2.2.1.4. Utjecaj temperature u procesu fermentacije

Temperatura tijekom SSF utječe na rast i metabolizam radnog mikroorganizma i jedan je od najvažnijih parametara procesa. Veliki problem predstavlja akumulacija metaboličke topline tijekom uvećanja SSF procesa od laboratorijskog do industrijskog mjerila. U logaritamskoj fazi rasta mikroorganizama, razlika u gradijentu temperature uzrokovana metaboličkim nakupljanjem topline može iznositi i do 3 °C, uzrokujući isparavanje vode iz supstrata. Osim toga, toplinska vodljivost zraka znatno je niža u usporedbi s toplinskom vodljivošću vode. Stoga, kada se koristi plin kao kontinuirana faza (što je jedna od osnovnih razlika SSF procesa od SmF u kojemu je voda kontinuirana faza), teško je postići visoku učinkovitost prijenosa topline (Zhang i sur., 2017).

Tijekom SSF procesa hife radnog mikroorganizma se isprepliću i adsorbiraju na čestice supstrata, mijenjajući mehanička svojstva supstrata i otežavajući prijenos mase i energije tijekom fermentacije. Rezultati istraživanja provedenog od grupe autora Zhang i sur. (2017) pokazali su da u početnoj fazi SSF procesa postoje pozitivne korelacije indeksa mehaničkih svojstava

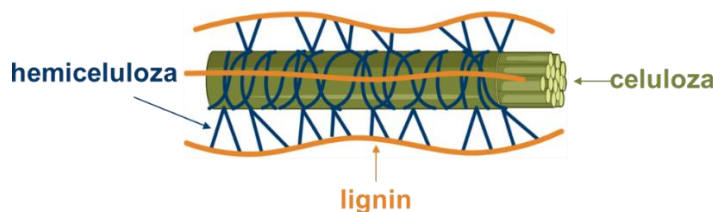
supstrata s toplinskom vodljivošću i zadržavanjem vode supstrata te negativne korelacije s propusnošću plina i toplinskom difuzivnošću. Tijekom prvih 100 sati SSF procesa, indeks mehaničkih svojstava supstrata bio je u pozitivnoj korelaciji s provođenjem topline i zadržavanjem vode u mediju, što je bilo korisno za rast stanica. U nastavku SSF procesa tijekom 100 – 168 h, akumulacija topline, slaba difuzivnost topline i slaba propusnost plina ukazuju na smanjenje učinka fermentacije. Rezultati su pokazali da su fizikalna svojstva medija značajno utjecala na prijenos topline i mase te dodatno utjecala na performanse SSF procesa. Konkluzivan ishod cjelokupnog istraživanja sugerirao je da bi indeks mehaničkih svojstava supstrata mogao sveobuhvatno karakterizirati fizikalna svojstva medija, što bi moglo biti korisno za definiranje početnih uvjeta i kontrole SSF procesa.

Nizak sadržaj vode, nedovoljna toplinska vodljivost supstrata, ograničenje miješanja supstrata tijekom fermentacije neki su od čimbenika koji utječu na prijenos topline tijekom SSF procesa (Chen, 2013). Razvoj matematičkih modela te sustavno praćenje i kontrola temperature neophodni su za postizanje optimalnih procesnih parametara fermentacije (Figueroa-Montero i sur., 2011). Dalsenter i sur. (2005) definirali su kinetički model rasta mikroorganizma koji uključuje temperaturne oscilacije koje se obično javljaju tijekom provedbe SSF procesa. Prema modelu, konstanta specifične brzine rasta mikroorganizma ovisi o koncentraciji esencijalnih komponenti hranjive podloge, dok sinteza ili razgradnja tih esencijalnih komponenti izravno ovisi o temperaturi. Bilance plina, vode i energije definirane su kako bi se opisao SSF proces i uspostavili matematički modeli koji opisuju proces fermentacije u bioreaktorima različitih konstrukcija (Mitchell i sur., 2003). Međutim, tijekom fermentacije fizikalno-kemijska struktura supstrata nije konstantna, što utječe na poroznost supstrata i prijenos mase i topline čime je monitoring SSF procesa otežan (Chen, 2013).

### **2.2.2. Kemijski sastav lignoceluloznih supstrata korištenih u provedbi fermentacije na čvrstim nosačima**

Poljoprivredno-prehrambeni ostaci, nusproizvodi ili otpad koji se koriste kao supstrati u SSF procesu s obzirom na kemijski sastav mogu se podijeliti na škrobne ili lignocelulozne sirovine. Lignoceluloza je najzastupljenija obnovljiva biomasa na Zemlji. Prema statistici, svake godine u svijetu se proizvede  $1,55 \times 10^{11}$  tona lignocelulozne biomase. U odnosu na ukupnu suhu tvar lignocelulozne biomase, najveći udio imaju biopolimeri celuloza (35% ~ 50%), hemiceluloza (20% ~ 35%) i lignin (5% ~ 30%) (**Slika 4**) te tvari koje se mogu ekstrahirati (kao što su šećeri, lipidi, proteini, polifenoli, topljivi minerali) (Ali i sur., 2020). Korištenje nusproizvoda iz poljoprivredno-

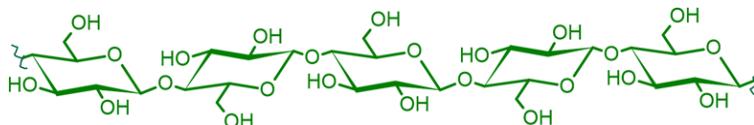
prehrambenog sektora u proizvodnji bioplina, biogoriva, biognojiva, bioaktivnih spojeva i lijekova u skladu je s održivim razvojem i poslovnim modelom recikliranja otpada u biogospodarstvu (Šelo i sur., 2021). Kemijski sastav osnovnih komponenti (biopolimera) lignoceluloznih supstrata ukratko je objašnjen u sljedećim poglavljima.



**Slika 4.** Osnovne komponente lignocelulozne biomase<sup>1</sup>

### 2.2.2.1. Celuloza

Celuloza ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> je široko rasprostranjeni dugolančani organski polimer biljnog porijekla. Strukturna je komponenta biljnih stanica i tkiva. Celuloza je netopljiva u vodi i sastoji se od monomernih jedinica β-D-glukoze povezanih β-(1,4)-glikozidnim vezama (**Slika 5**). Stupanj polimerizacije celuloze (broj monomernih jedinica β-D-glukoze) definira svojstva celuloze (Haldar i Purkait, 2020).



**Slika 5.** Kemijska struktura celuloze<sup>2</sup>

Linearna molekula celuloze tvori paralelne mikrokristalne niti povezane vodikovim vezama u celuloznim fibrilama, što otežava njezinu razgradnju. Na povišenim temperaturama, vodikove veze koje podupiru kristalnu strukturu celuloze se prekidaju, poboljšavajući topljivost celuloze (Periyasamy i sur., 2022). Mikrokristalna celuloza koristi se u raznim industrijama zbog svoje netoksičnosti, visokih sorpcijskih svojstava, kemijske inertnosti i higroskopnosti (Periyasamy i sur., 2022). Koristi se kao farmaceutski ekscipijent, u prehrambenoj industriji (stabilizator, sredstvo protiv zgrudnjavanja, supstituent za masti, emulgator, sredstvo za želiranje, sredstvo za

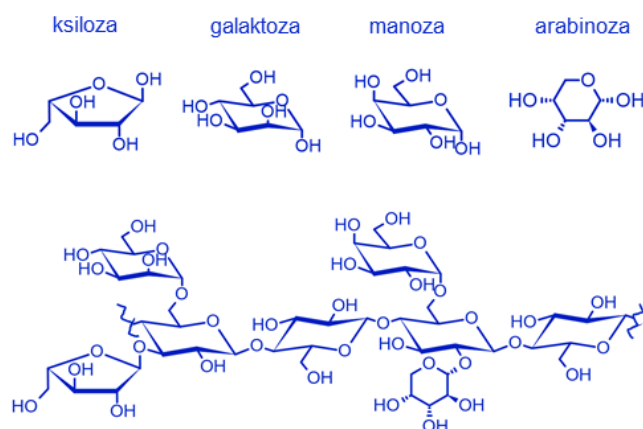
<sup>1</sup> Za izradu shematskog prikaza korišten program BioRender (<https://app.biorender.com/>)

<sup>2</sup> Za izradu kemijske strukture korišten program ACD/ChemSketch (Freeware) 2021.1.1

suspendiranje) te u kozmetici kao zamjena za masti i zgušnjivač. Celuloza je važna sirovina koja se može koristiti za proizvodnju biogoriva, u razvoju sofisticiranih materijala za dijagnostiku, u medicini uključujući 3D printanje farmaceutskih proizvoda i termoplastičnih kompozita, u procesima pročišćavanja vode, proizvodnje bioplastike i agrokemikalija (Periyasamy i sur., 2022).

### 2.2.2.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza je heteropolisaharid koji se sastoji od različitih jednostavnih monomernih šećera (heksoze:  $\beta$ -D-manoza,  $\alpha$ -D-galaktoza, pentoze:  $\beta$ -D-ksiloza,  $\alpha$ -L-arabinoza) i alduronskih kiselina ( $\alpha$ -D-4-O-metil galakturonska kiselina,  $\alpha$ -D-glukuronska kiselina i  $\alpha$ -D-galakturonska kiselina) (**Slika 6**). Najrasprostranjeniji gradivni element hemiceluloze u tvrdom drvetu i poljoprivrednim biljkama (kao što su trave i slama) je arabinoksilan. Arabinoksilan se sastoji od  $\alpha$ -(1,4)-D-ksilopiranozilnih jedinica povezanih s  $\alpha$ -(1,2)- i/ili  $\alpha$ -(1,3)-L-arabinofuranozilnim jedinicama. U manjoj mjeri, jedinice ksiloze mogu biti supstituirane s 4-O-metil eter glukuronskom kiselinom (Zhang i sur., 2011). U mekom drvetu glukomanan je građevni blok hemiceluloze. To je ravnolančani polimer D-manoze i D-glukoze povezanih  $\beta$ -1,4-glukozidnim vezama (Maity, 2015). Za razliku od celuloze, razgranati lanac hemiceluloze ima manju molekulsku masu, niži stupanj polimerizacije (oko 150 – 200 monomera) i amorfne je prirode te se zbog toga lakše hidrolizira do monomernih komponenti. Iz navedenog razloga, tijekom termo-kemijske hidrolize hemiceluloze moguće su degradativne reakcije ugljikohidrata što rezultira formiranjem furfurala i hidroksil metil furfurala (Yousuf i sur., 2020).



**Slika 6.** Kemijska struktura hemiceluloze i pripadajućih monomernih jedinica<sup>3</sup>

Budući da je hemiceluloza biorazgradiva, ima široku industrijsku primjenu. Zbog svojih kemijskih svojstava, hemiceluloza je podložna različitim modifikacijama (Zhang i sur., 2011). Veliki broj

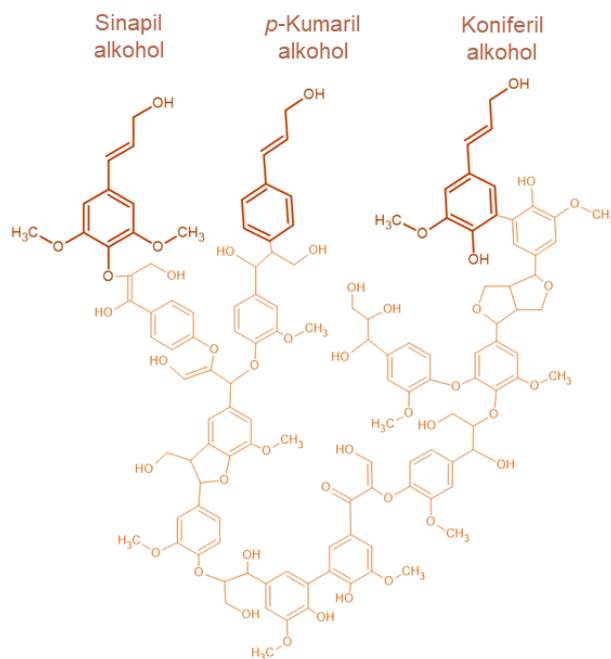
<sup>3</sup> Za izradu kemijske strukture korišten program ACD/ChemSketch (Freeware) 2021.1.1



hidroksilnih skupina u lancu hemiceluloze čini ih lako dostupnim za kemijske modifikacije u proizvodnji karboksimetil i acilirane hemiceluloze. Kemijski modificirana hemiceluloza može se koristiti u proizvodnji biopolimera koji imaju sposobnost ionske vodljivosti (Weerasooriya i sur., 2021). Također, hemiceluloza se može koristiti kao sirovina za proizvodnju bioetanol, butanol i ksilitola, furfurala i njegovih derivata, hidroksimetilfurfurala i njegovih derivata, jantarne kiseline i njezinih derivata, mliječne kiseline, levulinske kiseline, sorbitola, ksilitola i drugih visokovrijednih produkata i derivata šećera (Takkellapati i sur., 2018).

### 2.2.2.3. Lignin

Lignin je amorfni aromatski polimer trodimenzionalne strukture. Netopljiv je u vodi i izvor je aromatskih spojeva (sinapil, *p*-kumaril i koniferil alkohol). Lignin pokazuje visok indeks polidisperznosti s različitim grananjem i međusobnim povezivanjem osnovnih građevnih jedinica (Yoo i sur., 2020) (**Slika 7**).



**Slika 7.** Kemijska struktura lignina i osnovnih aromatskih jedinica<sup>4</sup>

Zbog različitih vrsta kemijskih veza koje nastaju povezivanjem različitih funkcionalnih skupina (aromske fenolne hidroksilne i metoksilne skupine, aldehidne i ketonske karbonilne skupine, primarnih i sekundarnih alifatskih hidroksilnih skupina te karboksilne skupine), lignin ima iznimna

<sup>4</sup> Za izradu kemijske strukture korišten program ACD/ChemSketch (Freeware) 2021.1.1

mehanička svojstva koja otežavaju njegovu degradaciju (Poveda-Giraldo i sur., 2021). Štoviše, okosnica hemiceluloze može biti povezana s mikrokristalnom celulozom vodikovim vezama te svojim bočnim ogrankom hemiceluloza je povezana preko ferulinske kiseline s ligninom čime se formira kompleksni polimer celuloze/hemiceluloze/lignina koji se teško razgrađuje (Ali i sur., 2020). Iz tog razloga, lignin doprinosi čvrstoći biljnih stanica, štiteći ih od mikrobne degradacije i osiguravajući nepropusnost vodoopskrbnog sustava kroz biljku (Behling i sur., 2016).

Zbog svoje rezistentnosti, veliki broj istraživanja usmjeren je prema razvoju tehnologija u svrhu učinkovite razgradnje lignina čija valorizacija postaje bitan aspekt u biorafinerijama. U preglednom istraživanju dostupne literature provedenog od Poveda-Giraldo i sur. (2021) detaljno je navedena i objašnjena metodologija depolimerizacije lignina pomoću termokemijskih, kemijskih i biokemijskih metoda. Prvi korak valorizacije lignina je njegova izolacija iz polimernog kompleksa celuloza/hemiceluloza/lignin različitim toplinskim, kemijskim ili biokemijskim metodologijama (Anderson i sur., 2017). U ovisnosti o strukturi, lignin je u određenoj mjeri topiv u alkoholima male molekulske mase, piridinu, dimetil sulfoksidu, acetonu i dioksanu, dok povišena temperatura u kombinaciji s kiselinom doprinosi depolimerizaciji lignina (Yoo i sur., 2020). Nakon izolacije, provodi se konverzija lignina različitim metodama. Hidroprocesiranjem lignina moguće je dobiti produkte poput benzena, fenola, anisola, guacamola, fenil etanola, cikloheksil etanola, etilbenzena i toluena. Katalitičkom oksidacijom lignina dobiveni su produkti siringaldehid, *p*-hidroksibenzaldehid, vanilin, vanilin kiselina, mukonolakton, siringol, veratraldehid, hidroksiketon, benzaldehid, *p*-benzokinon. Biološkom razgradnjom različitih lignoceluloznih materijala pomoću mikroorganizama zabilježena je visoka razgradnja lignina (od 14% do 53,3%) (Poveda-Giraldo i sur., 2021). Prema navedenom, može se zaključiti da je valorizacijom lignina moguća proizvodnja širokog spektra monomernih i dimernih visokovrijednih spojeva.

#### 2.2.2.4. Kemijski sastav supstrata iz industrije hladno prešanog ulja

Uljane pogače su nusproizvodi preostali nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki biljaka. Ovisno o metodi obrade sjemena uljarica i iskorištenju procesa, uljne pogače predstavljaju 50% početne mase sjemenki (Mirpoor i sur., 2021). Budući da tijekom proizvodnje ulja zaostaje velika količina biomase, njihova valorizacija ključna je u sprječavanju akumulacije biološkog otpada. Ako se proizvodnja ulja provodi hladnim prešanjem (a ne ekstrakcijom pomoću organskih otapala ili toplim prešanjem), uljne pogače predstavljaju izvor visokovrijednih kemijskih spojeva (Mirpoor i sur., 2021). U **Tablici 3** prikazan je kemijski sastav za pogaču buče (Budžaki i sur., 2018a), ricinusa (Burlein i Rocha, 2014; Akande i sur., 2016; Annongu i sur. 2017; Ferreira i sur., 2022), suncokreta

(Geneau-Sbartaï i sur., 2008; Grasso i sur., 2019; Mirpoor i sur., 2021), sezama (Yasothai, 2014; Melo i sur., 2021; Mirpoor i sur., 2021), konoplje (Budžaki i sur., 2018a; Mirpoor i sur., 2021), lana (Budžaki i sur., 2018a; Mannucci i sur., 2019; Drożdowska i sur., 2020) i masline (Nunes i sur., 2018; Gómez-Cruz i sur., 2020; Ribeiro i sur., 2020).

**Tablica 3.** Kemijski sastav uljnih pogača

	Pogača buče	Pogača ricinusa	Pogača suncokreta	Pogača sezama	Pogača konoplje	Pogača lana	Komina masline
Suha tvar [%]	93,07	85,00 – 95,00	95,41	96,30	92,92	92,09 – 92,91	99,07
Pepeo [% <sub>st</sub> ]	7,82	8,10 – 19,20	6,50 – 8,00	5,30 – 7,90	7,20 – 7,50	4,50 – 5,90	1,90 – 6,41
Sirovi proteini [% <sub>st</sub> ]	38,27	21,00 – 48,00	32,00 – 42,60	29,60 – 40,90	24,77 – 47,90	32,83 – 41,97	7,40 – 8,75
Ekstrakt etera [% <sub>st</sub> ]	36,22	4,23 – 36,87	1,50 – 2,90	7,20 – 27,80	5,20 – 12,34	6,11 – 21,40	15,61
Sirova vlakna [% <sub>st</sub> ]		2,50 – 24,50	29,00 – 43,00	21,70	39,20 – 56,20	6,29	35,90
NDF [% <sub>st</sub> ]	10,51				53,43	18,83	46,48
ADF [% <sub>st</sub> ]	5,12				39,19	14,22	31,06
ADL [% <sub>st</sub> ]	0,74				16,69	6,02	
Hemiceluloza [% <sub>st</sub> ]	5,39	26,46	10,90		14,24	4,61 – 18,35	10,94
Celuloza [% <sub>st</sub> ]	4,38	9,62	18,30		22,50	8,20 – 11,86	9,67
Lignin [% <sub>st</sub> ]	0,74	21,94	9,10		16,69	6,02	21,82
Topivi ugljikohidrati [% <sub>st</sub> ]	2,74	9,10 – 20,50			1,84	2,20	6,56

Pregledom literaturnih podataka može se zaključiti da uljne pogače sadrže visok udio pepela koji ujedno predstavlja sadržaj mineralnih tvari. Udio pepela i sastav mineralnih tvari bitno je poznavati budući da pepeo predstavlja anorganski ostatak kojega je potrebno zbrinjavati nakon termičke valorizacije uljne pogače ili može utjecati na toksikološku i nutritivnu kvalitetu ako se uljna pogača koristi za proizvodnju hrane i hrane za životinje (Bakker i Elbersen, 2005; Harris i Marshall, 2017). Visoki udio proteina sadržan u uljnim pogačama predstavlja visokovrijednu sirovinu u procesu proizvodnje ekstrakta i proteinskih hidrolizata (biološki aktivnih peptida i esencijalnih aminokiselina) koji se mogu primijeniti u prehrambenoj industriji kao funkcionalna komponenta ili kao alternativni izvor proteina (Kotecka-Majchrzak i sur., 2020). Literaturni podatci koji se odnose na ekstrakt etera predstavlja udio zaostalog ulja i svih lipofilnih komponenti (poput pigmenata) iz uljarice. Udio zaostalog ulja ovisi o podrijetlu sirovine i načinu prerade koji se koristi u proizvodnji ulja. Nakon ekstrakcije ulja iz sjemenki dolazi do povećanja masenog udjela sirovih vlakana, celuloze, hemiceluloze i lignina u uljnoj pogači čija je važnost i vrijednost opisana u prethodnim poglavljima. Kemijski sastav uljnih pogača bitno je poznavati ako će se uljna pogača koristiti kao supstrat u SSF procesu. Odnosno, određeni udio proteina ili lipida može imati supresivni ili inducibilni učinak na proizvodnju proteaza ili lipaza (Sarkar i sru., 2021). Osim toga, mali udio topivih ugljikohidrata i veliki udio celuloze i hemiceluloze mogu utjecati na proizvodnju hidrolitičkih enzima radnog mikroorganizma. Veliki značaj primjene lignoceluloznih sirovina kao supstrata u proizvodnji visokovrijednih produkata biološkom konverzijom objašnjen je u idućem poglavlju s fokusom na piramidu bioproizvoda dobivenih valorizacijom uljnih pogača.

### **2.2.3. Proizvodnja visokovrijednih produkata fermentacijom na čvrstim nosačima**

Tradicionalna proizvodnja hrane uzgojem mikroorganizama u SSF procesu odvija se od davnina. Namirnice dobivene SSF procesom, poput kruha, sira, vina, soja umaka i alkoholnog octa, dio su svakodnevnih potreba ljudi. S razvojem tehnologije, SSF proces je pokazao svoju moguću primjenu u farmaceutskoj i kemijskoj industriji za proizvodnju sekundarnih metabolita radnog mikroorganizma (aminokiseline, vitamini i druge biološki aktivne tvari kao što su antibiotici, bakterijski toksini, auksini, lijekovi za imunitet i alkaloidi) (Chen, 2013). Kao što je prethodno spomenuto, nusproizvodi, ostaci ili otpad iz poljoprivredno-prehrambenog sektora predstavljaju izvore hranjivih tvari potrebnih za rast i metaboličku aktivnost različitih mikroorganizama, čiji uzgoj tijekom SSF procesa rezultira proizvodnjom širokog spektra visokokvalitetnih proizvoda. Proizvodnja različitih visokovrijednih bioprodukata prikazana je u **Tablici 4**.

**Tablica 4.** Uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima u svrhu proizvodnje visokovrijednih bioprodukata

Mikroorganizam	Supstrat	Produkt	Referenca
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Pivski trop	Proteini	Canedo i sur., 2016
<i>Trichoderma reesei</i> <i>Penicillium decumbens</i>	Šećerna trska, pšenične mekinje	Ugljikohidrati (reducirajući šećeri)	Liu i sur., 2015
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Pogača uljane repice i otpadna melasa	Masti (dokosaheksaenoična kiselina (DHA))	Gong i sur., 2015
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Slama	Organske kiseline (oksalna kiselina)	Saber i sur., 2010
<i>Rhizopus oryzae</i>	Trop grožđa	Polifenoli	Šelo i sur., 2023
Različiti sojevi kvasca	Komina jabuke	Nositelji arome (identificirano 132 komponente)	Madrera i sur., 2015
<i>Mucor rouxii</i>	Pogača i ljuske od soje	Biopolimeri (kitozan)	Mondala i sur., 2015
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ljuska sjemenki suncokreta	Biosurfaktanti	Velioğlu i Ürek, 2015
<i>Trametes versicolor</i>	Kukuruzna silaža	Lakaza	Bucić-Kojić i sur., 2017
<i>Trametes versicolor</i>	Kukuruzna silaža	Mangan peroksidaza	Bucić-Kojić i sur., 2017
<i>Aspergillus niger</i>	Pogača kikirikija	$\alpha$ -Amilaza	Suganthi i sur., 2011
<i>Aspergillus niger</i>	Kukuruzovina	$\alpha$ -L- Arabinofuranozidaza	Patel i sur., 2015
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Kukuruz	$\beta$ -Glukozidaza	Wang i sur., 2013
<i>Termitomyces clypeatus</i>	Stabljika i slama gorušice	Celulaza	Hu i sur., 2012
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Pšenične mekinje	Ksilanaza	Gaffney i sur., 2009

<i>Aspergillus niger</i>	Komina limunove kore	Pektinaza	Ruiz i sur., 2012
<i>Aspergillus oryzae</i>	Pogača soje	Proteaza	Thakur i sur., 2015
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Pšenične mekinje	Lipaza	Dobrev i sur., 2018
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Rižine mekinje	Fitaza	Berikten i Kivanc, 2014
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Komunalni organski otpad	Biopesticidi	Molina-Penate i sur., 2022
<i>Trichoderma reesei</i> <i>Penicillium decumbens</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Šećerna trska, pšenične mekinje	Biogoriva (bioetanol)	Liu i sur., 2015
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Ljuska crnog graha, rižine mekinje, ljuska kikirikija i suho lišće	Biognojiva	Bibi i sur., 2022
<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida utilis</i>	Lanena pogača	Hrana za životinje	Zhai i sur., 2019

Uzgoj gljiva na čvrstim nosačima ima veliku primjenu u proizvodnji enzima. Usporedno sa SmF procesom, SSF proces simulira uvjete u kojima gljive prirodno rastu, što rezultira većom proizvodnjom enzima (Usha i sur., 2014). Dodatnu vrijednost SSF procesa očituje se u primjeni fermentiranih produkata kao potencijalnih izvora enzima i/ili živih stanica radnog mikroorganizma. Na primjer, organska gnojiva proizvedena SSF procesom sadrže žive stanice mikroorganizama koje mogu imati pozitivan učinak na ekosustav i poboljšati kvalitetu tla. Time dolazi do povećanja željenog prinosa usjeva, a istovremeno se smanjuje pritisak na ekosustav zbog upotrebe mineralnih gnojiva (Anuradha Jabasingh i sur., 2014). Osim toga, biognojiva dobivena SSF procesom mogu se koristiti za obogaćivanje tla mineralima u organskom uzgoju (Medina i sur., 2004). Lignocelulozni ostaci iz raznih industrija (prehrambena industrija, industrija prerade poljoprivrednih proizvoda) predstavljaju povoljan supstrat za SFF proces u proizvodnji različitih visokovrijednih proizvoda, poput fermentirane hrane za prehranu životinja. Pro tome, cilj SSF procesa je povećati nutritivnu vrijednost stočne hrane povećanjem sadržaja proteina ili razgradnjom potencijalno toksičnih spojeva (pesticida) u otpadu (Aggelopoulos i sur., 2013). Drugim riječima, primijenjeni supstrat nakon biološke obrade tijekom SSF procesa više se ne

može smatrati otpadom što značajno doprinosi u gospodarenju i zbrinjavanju otpada (Hsu i sur., 2013).

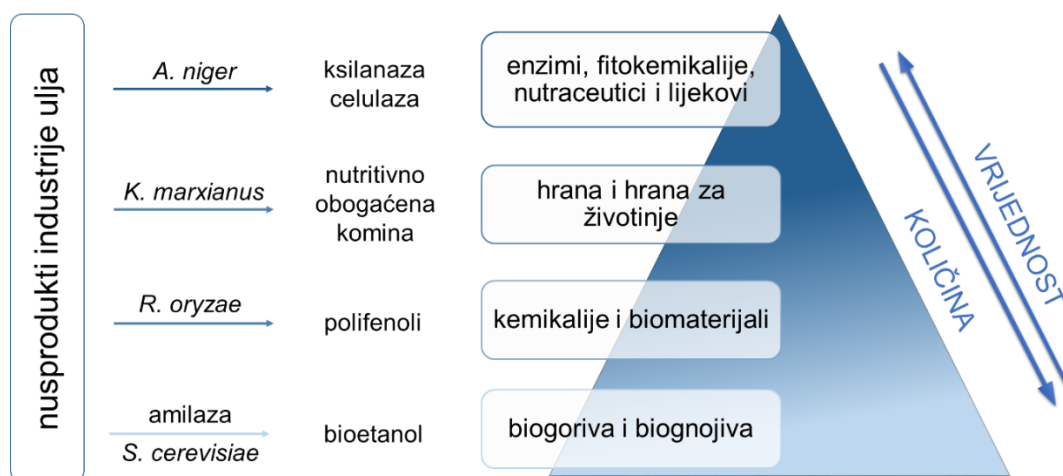
Sukladno pregledu proizvodnje bioprodukata tijekom SSF procesa te svim navedenim činjenicama, može se zaključiti da uzgoj mikroorganizama na lignoceluloznim supstratima doprinosi primjeni i razvoju biorafinerije s ciljem ekološke i ekonomske valorizacije nusprodukata ili otpada različitih industrija. Biološkom konverzijom lignocelulozne biomase tijekom SSF procesa moguća je proizvodnja širokog spektra bioprodukata, ali u različitim količinama i s različitim (tržišnim) vrijednostima. Kako bi se vizualizirao odnos između količine i vrijednosti bioproizvoda dobivenih kroz SSF proces, moguće je konstruirati piramidu bioproizvoda (Orejuela-Escobar i sur., 2021). U tom slučaju, proizvodi s najvećom potražnjom na tržištu (npr. biogoriva i biognojiva) čine bazu piramide, dok je njihova dodana vrijednost najmanja. Samim time, troškovi proizvodnje i cijena produkta trebala bi biti niska. Krećući se prema vrhu piramide, sljedeću kategoriju čine kemikalije i biomaterijali čija je tržišna potražnja manja u odnosu na kategoriju s dna piramide bioprodukata. Ovi proizvodi obično zahtijevaju naprednu tehnološku obradu, što povećava troškove, a time i njihovu tržišnu vrijednost. Prateći hijerarhijski poredak dolazi se do kategorije kojoj pripadaju hrana i hrana za životinje. Budući da su proizvodnja i zdravstvena ispravnost hrane i hrane za životinje strogo regulirana zakonodavstvom, samim time im raste i tržišna vrijednost. Na vrhu piramide nalaze se bioprodukti vrlo visoke vrijednosti kao što su enzimi, fitokemikalije, nutraceutici i lijekovi koji su izolirani ili ekstrahirani iz supstrata u malim količinama i potrebni su u manjim količinama, ali njihova je dodana vrijednost vrlo visoka (Williamson i sur., 2020).

Na temelju dostupnih literaturnih podataka konstruirana je piramida bioprodukata dobivenih biološkom valorizacijom uljnih pogača (**Slika 8**). U istraživanju provedenog od grupe autora Leite i sur. (2016) komina masline korištena je kao supstrat za uzgoj *A. niger* s ciljem proizvodnje koktela enzima ksilanaze i celulaze. U navedenoj studiji razvijena je metoda predobrade komine masline ultrazvukom, što je dovelo do poboljšanja proizvodnje ksilanaze. Dobiveni koktel enzima može se koristiti u procesu saharifikacije biomase za proizvodnju šećera i proširenje opsega proizvodnje kemikalija iz ugljikohidrata. Komina masline može se koristiti u procesu kompostiranja i proizvodnje stočne hrane. Međutim, zbog rezidualnog sadržaja ulja i polifenola, kao i niskog sadržaja bjelančevina, nužna je pravilna prethodna obrada komine za proizvodnju stočne hrane.

Biološkom obradom komine masline pomoću *Kluyveromyces marxianus* došlo je do povećanja udjela sirovih proteina, masti i ugljikohidrata (Fathy i sur., 2018). Nadalje, tijekom istraživanja provedena je analiza udjela tanina. Tanini se mogu vezati za proteine i minerale, sprječavajući njihovu probavu i apsorpciju. Osim toga, tanini mogu inhibirati probavne enzime. Zbog gore

spomenutih antinutritivnih svojstava, tanini nisu poželjni sastojci stočne hrane. Analiza biološki obrađene komine masline pokazala je da se sadržaj tanina nakon fermentacije smanjio za 96,75%.

Uzgoj *R. oryzae* na komini masline povećao je ekstraktibilnost polifenolnih spojeva za 12,9 puta (Leite i sur., 2019). Također, nusprodukti industrije ulja mogu se koristiti kao visokokvalitetne sirovine u procesu proizvodnje biogoriva. Primjerice, bučina pogača korištena je u procesu dvostupanjske biološke obrade s ciljem proizvodnje bioetanol. U prvom stupnju, provedena je saharifikacija polisaharida buče djelovanjem amilolitičkih enzima. Nakon saharifikacije, provedena je alkoholna fermentacija pomoću *S. cerevisiae* (Yesmin i sur., 2020).



**Slika 8.** Piramida bioprodukata dobivenih biološkom obradom nusprodukata industrije ulja

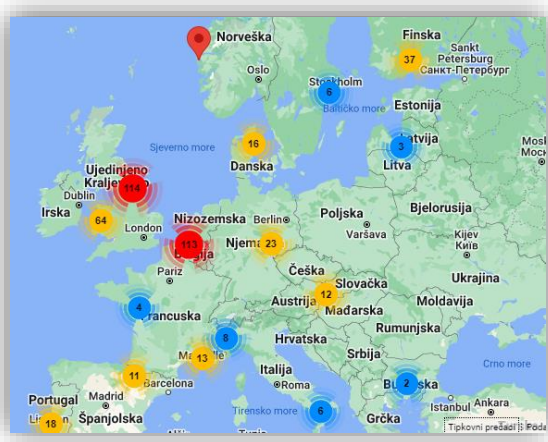
Biorafinerije karakterizira multidisciplinarni oblik održivog industrijskog razvoja usmjeren na mogućnost proizvodnje više bioproizvoda tijekom vremena s najvećom mogućom dodanom vrijednošću koja je tehnički i ekonomski opravdana (Escamilla-Alvarado i sur., 2016). Na temelju navedenih činjenica više je nego jasan razvojni potencijal biorafinerije temeljene na SSF procesu. Dostupnost i relativno niska cijena širokog spektra različitih industrijskih nusproizvoda čini ih poželjnom sirovinom za proizvodnju bioproizvoda visoke vrijednosti (Sassner i sur., 2008). U bibliografskom pregledu istraživačkog rada autorske skupine Sarkar i sur. (2021) prikazan je potencijal iskoristivosti različitih uljnih pogača i njihove komercijalne upotrebe primjenom različitih biotehnoloških pristupa. Valorizacija uljnih pogača na principima biorafinerije predstavlja izazov, ali u isto vrijeme omogućuje recikliranje nusprodukata prehrambene industrije. Iskorištavanjem



takvih obnovljivih sirovina u proizvodnji bioprodukata s dodanom vrijednošću u konačnici pozitivno djeluje na gospodarski rast.

#### 2.2.4. Bioreaktori korišteni u provedbi fermentacije na čvrstim nosačima

Biološka obrada različitih lignoceluloznih materijala uzgojem mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima ima višestruku primjenu, ne samo u laboratorijskom nego i u industrijskom mjerilu. Pretraživanjem Pilots4U baze podataka postojećih pilot i demo infrastruktura (kategorija: Industrijska biotehnologija; područje: fermentacija na čvrstim nosačima) rezultiralo je pretragom 463 postrojenja u Europi (**Slika 9**) (Pilots4U Bioeconomy Innovation Database). Rezultati pretrage nisu dali podatke o infrastrukturnim postrojenjima za Hrvatsku upisanih u bazu podataka.



**Slika 9.** Rezultati pretraživanja Pilots4U baze podataka za infrastrukturna postrojenja temeljena na industrijskoj biotehnologiji u području provedbe fermentacije na čvrstim nosačima (izvor: Pilots4U)

Sukladno navedenom, industrijski potencijal SSF procesa i iskorištavanje lignocelulozne biomase još nije u potpunosti iskorišten. Navedena činjenica posljedica je svih izazova koje donosi razvoj SSF procesa. Prvo, složenost kemijskog sastava i heterogenost supstrata zahtijeva optimizaciju SSF procesa za svaki supstrat i radni mikroorganizam posebno. Nadalje, kompleksnost kontrole velikog broja procesnih parametara u statičkim uvjetima koji rezultiraju generiraju gradijenta u koncentraciji nutrijenata, vode, pH supstrata te akumulaciji metaboličke topline, zahtjevi su koje je potrebno uzeti u obzir prilikom dizajniranja bioreaktora. Na temelju načina rada, bioreaktori koji se trenutno koriste u SSF procesu mogu se podijeliti na četiri kategorije: (i) bioreaktor s pliticama (engl. *tray bioreactor*), (ii) bioreaktor s pakiranim slojem (engl. *packed bed bioreactor*), (iii)

bioreaktor s pulsacijom komprimiranog zraka (engl. *air pressure pulsation bioreactor*), (iv) bioreaktori s povremenim ili kontinuiranim miješanjem (engl. *intermittent or continuously mixed SSF bioreactors*) (Arora i sur., 2018). U posljednjih nekoliko godina provedena su istraživanja i razvoj SSF procesa koja su izvijestili o nekoliko bioreaktorskih sustava koji su barem djelomično prevladali navedene izazove, no još uvijek postoji veliki prostor za poboljšanje biotehnoloških procesa (Arora i sur., 2018). Primjeri primjene različitih vrsta bioreaktora u SSF procesu s ciljem uvećanja mjerila valorizacije različitih supstrata navedeni u sljedećim poglavljima.

#### 2.2.4.1. Bioreaktor s pliticama

Bioreaktor s pliticama je vrsta bioreaktora koji se koristi u proizvodnji tradicionalnih proizvoda kao što su tempeh i soja umak (Ali i Zulkali, 2011). Osnovne jedinice bioreaktora su termostatske komore i plitice koje mogu biti izrađene od različitih materijala (drvo, metal ili plastika), s perforacijama ili bez perforacija. Plitice na koje se nanosi supstrat složene su jedna iznad druge unutar komore bioreaktora. Tijekom provedbe SSF procesa moguća je kontrola temperature i vlažnosti zraka unutar komore bioreaktora. Uvećanje mjerila SSF procesa u bioreaktoru s pliticama moguća je povećanjem broja plitica u bioreaktoru i/ili povećanjem površine plitica (odnosno korištenjem plitica velikih dimenzija). U **Tablici 5** navedeni su primjeri provedbe SSF procesa u bioreaktoru s pliticama.

**Tablica 5.** Proizvodnja visokovrijednih bioprodukata uzgojem mikroorganizama na čvrstim nosačima u bioreaktoru s pliticama

Mikroorganizam	Supstrat	Produkt	Referenca
<i>Aspergillus giganteus</i>	Pšenične mekinje, kora naranče i limuna	Pektinaza	Ortiz i sur., 2017
<i>Aspergillus oryzae</i>	Rižine posije, pšenične posije, pogača soje i pšenično brašno	Proteaza	Fath i Fazaelpoor, 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	Palmina pogača i palmına prešana vlakna	Proteaza	Tsouko i sur., 2017
<i>Rhizopus oryzae</i>	Pšenične mekinje i pogača lana	Fitaza	Rani i sur., 2011
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Babassu (ostaci palme)	Lipaza	da Silva i sur., 2020

<i>Aspergillus niger</i>	Uljna pogača suncokreta, uljane repice i soje	Celulaza, ksilanaza, $\beta$ -glukozidaza i proteaza	Sousa i sur., 2023
--------------------------	---	--	--------------------

#### 2.2.4.2. Bioreaktor s fiksnim slojem

Konstrukcija bioreaktora s fiksnim slojem sastoji se od cilindrične staklene ili metalne cijevi/bubnja u koju se postavlja supstrat. Stijenke cilindra ili bubnja mogu biti obložene izmjenjivačima topline u svrhu kontrole temperature unutar bioreaktora. Karakteristična značajka bioreaktora s fiksnim slojem je prisilna aeracija kroz statički sloj supstrata čime se osigurava kontinuirana opskrba kisikom i vlagom, te se umanjuje brzina nakupljanja metaboličke topline i plinova (Mitchell i sur., 2023). Bioreaktor s fiksnim slojem općenito se koristi u SSF procesima gdje je miješanje nepoželjno (mogućnost aglomeracije supstrata) ili negativno utječe na rast radnog mikroorganizma (mehaničko oštećenje hifa). Razvoj novih laboratorijskih SSF procesa obično zahtijeva izgradnju bioreaktora promjera od 5 do 15 cm i visine od 30 do 80 cm. Strategija uvećanja mjerila SSF procesa primjenom bioreaktora s fiksnim slojem temelji se na povećanju duljine cilindra bioreaktora ili povećanjem promjera bioreaktora. U jednom ili drugom slučaju potrebno je voditi računa o razvoju strategije sprječavanja akumulacije metaboličke topline (Finkler i sur., 2021). Temperatura u nekim dijelovima sloja supstrata može doseći tako visoke vrijednosti da usporava rast ili uzrokuje inhibiciju radnog mikroorganizma. Istraživanja su pokazala da ako se cjelokupna masa supstrata “upakiranog” unutar bioreaktora podijeli na više slojeva u seriji, proces može rezultirati boljom regulacijom akumulacije metaboličke topline (Mitchell i sur., 2010). Primjeri provedbe SSF procesa u bioreaktora s fiksnim slojem prikazani su u **Tablici 6**.

**Tablica 6.** Proizvodnja visokovrijednih bioprodukata uzgojem mikroorganizama na čvrstim nosačima u bioreaktoru s fiksnim slojem

Mikroorganizam	Supstrat	Produkt	Referenca
<i>Myceliophthora</i> sp.	Šećerna trska i pšenične mekinje	Endoglukanaza	Zanelato i sur., 2012
<i>Aspergillus niger</i>	Šećerna trska i pšenične mekinje	Pektinaza	Pitol i sur., 2016
<i>Aspergillus niger</i>	Kora od banane	Limunska kiselina	Chysirichote, 2020
<i>Bacillus subtilis</i>	Odmašćena pogača soje, pšenične mekinje i ljuska riže	Iturin A i poli- $\gamma$ -glutaminska kiselina	Piedrahita-Aguirre i sur., 2014

### 2.2.4.3. Bioreaktor s pulsiranjem komprimiranog zraka

Princip rada bioreaktora s pulsiranjem komprimiranog zraka temelji se na periodičnom pulsiranju komprimiranog zraka s prisilnom cirkulacijom zraka. Visoki parcijalni tlak kisika u plinovitoj fazi tijekom kompresije ima za cilj povećati koncentraciju kisika u sloju fermentacijskog materijala. Nakon faze kompresije zraka u materijalu, dolazi do dekompresije što rezultira uklanjanjem metaboličke topline i CO<sub>2</sub>. Ponavljanjem ciklusa kompresije i dekompresije simuliraju se uvjeti miješanja, što ima velike prednosti u odnosu na smično miješanje (Chen i He, 2012). Samim time, moguće je ublažiti posljedice heterogenosti procesa u smislu generiranja gradijenta topline, pH, metabolita i sl (Liu i sur., 2007). Primjeri provedbe SSF procesa u bioreaktoru s pulsiranjem komprimiranog zraka prikazani su u **Tablici 7**.

**Tablica 7.** Proizvodnja visokovrijednih bioprodukata uzgojem mikroorganizama na čvrstim nosačima u bioreaktoru s pulsiranjem komprimiranog zraka

Mikroorganizam	Supstrat	Produkt	Referenca
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Zrno kukuruza, pšenične mekinje	Ksilanaza	Yang i sur., 2011
<i>Aspergillus niger</i>	Rižina slama	Feruloil esteraza	Zeng i Chen, 2009
<i>Trichoderma reesei</i>	Pšenična slama i pšenične mekinje	Celulaza	Chen i sur., 2014
<i>Aspergillus niger</i>	Pšenične mekinje, rižine mekinje, kora citrusa u prahu i kukuruzno brašno	Pektinaza, glukoamilaza, proteaza i celulaza	He i Chen, 2013

### 2.2.4.4. Bioreaktori s povremenim ili kontinuiranim miješanjem

Različite izvedbe bioreaktora s miješanjem konstruirani su s ciljem osiguravanja poboljšanog prijenosa topline i mase te lakše proliferacije radnog mikroorganizma u čvrstom supstratu. Optimizacija SSF procesa u bioreaktoru s miješanjem ima za cilj povećati produktivnost procesa uz minimalno miješanje krutog supstrata, budući da intenzivno miješanje može mehanički oštetiti biomasu radnog mikroorganizma. Osim toga, intenzivno miješanje velike količine vlažnog lignoceluloznog materijala zahtijeva utrošak energije (Arora i sur., 2018). Miješanje supstrata provodi se rotiranjem bubnja oko njegove središnje osi ili pomoću miješala različitih izvedbi

umetnutih unutar bubnja. Unutar rotirajućeg bubnja mogu postojati pregrade koje olakšavaju proces miješanja. Međutim, ova metoda miješanja manje je učinkovita od korištenja miješalice s lopaticom (Vandenberghes i sur., 2021). U **Tablici 8** navedeni su primjeri provedbe SSF procesa u bioreaktoru s miješanjem.

**Tablica 8.** Proizvodnja visokovrijednih bioprodukata uzgojem mikroorganizama na čvrstim nosačima u bioreaktoru s povremenim ili kontinuiranim miješanjem

Mikroorganizam	Supstrat	Produkt	Referenca
<i>Aspergillus niger</i>	Sojina pogača	Fitaza	Saithi i Tongta, 2016
<i>Aspergillus niger</i>	Odmašćene rižine mekinje	Amiloglukozidaza, egzo-poligalakturonaza	Colla i sur., 2017
<i>Aspergillus niger</i>	Komina jabuke	Limunska kiselina	Dhillon i sur., 2013
<i>Kluveromyces marxianus</i>	Šećerna trska	Etanol	Lin i sur., 2013

### 2.3. THERMOMYCES LANUGINOSUS

*Thermomyces lanuginosus* je filamentna gljiva prvotno izolirana iz krumpira 1899. Pripada skupini *Fungi imperfecti* (*Deuteromycetes*) te se razmnožava nespolno formirajući konidiofore, morfološki slične vegetativnim hifama. Životni ciklus *T. lanuginosus* sastoji se od dvije faze. Prva faza je vegetativna faza u kojoj dolazi do razvoja micelija. Druga faza je reproduktivna faza u kojoj se razvijaju konidiofori s konidijama (Xie i sur., 2020).

*T. lanuginosus* je termofilna gljiva koja raste na temperaturi od 20 °C do 60 °C uz temperaturni optimum oko 50 °C (Singh i sur., 2003). Termofilni mikroorganizmi mogu rasti i razmnožavati se pri povišenim temperaturama, u ovisnosti o njihovom jedinstvenom mehanizmu prilagodbe. Prvo, staničnu membranu termofilnih mikroorganizama karakterizira visoki stupanj zasićenosti masnim kiselinama čime dolazi do formiranja kompozitne smole posebne strukture u lipidnom dvosloju stanične membrane. Drugo, termofilni mikroorganizmi mogu sintetizirati termostabilne proteine koji su bogati leucinom, prolinom i glutamatom. Termička stabilnost takvih proteina znatno je veća od bakterijskih homolognih proteina. U konačnici, genetski materijal termofilnog mikroorganizma

sadrži povećane razine DNA G-C, koje imaju više vodikovih veza što rezultira formiranjem stabilnije strukture dvostruke spirale uzvojnice DNA (Chen, 2013).

Uzevši u obzir činjenicu da tijekom razgradnje organskog materijala dolazi do akumulacije topline što pogoduje rastu i razvoju termofilnih mikroorganizama, *T. lanuginosus* čini dio prirodne mikroflore raspadajućeg biološkog materijala poljoprivredne i šumarske industrije. Do danas izolirano je više sojeva *T. lanuginosus* iz otpadnog materijala kao što su juta, drvo bukve, kukuruzna silaža, pšenična slama, rezanci šećerne repe i drugi (Gomes i sur., 1993, Matsuzawa i sur., 1999).

### 2.3.1. Proizvodnja enzima uzgojem *Thermomyces lanuginosus*

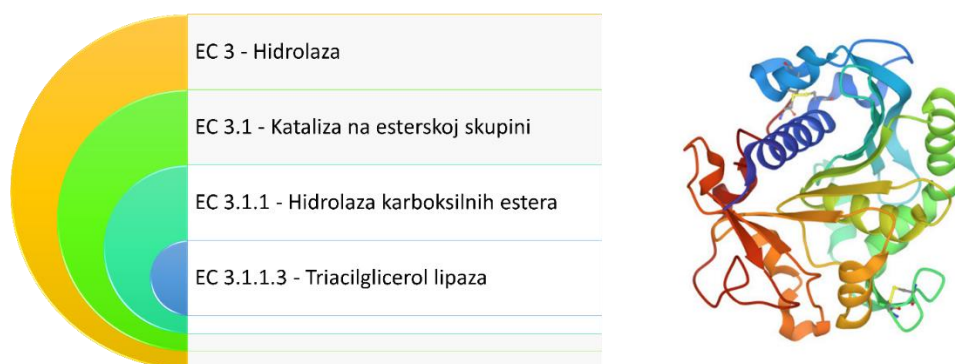
Uzgoj *T. lanuginosus* provodi se s ciljem proizvodnje velikog broja termostabilnih enzima od znanstvenog i komercijalnog interesa kao što su  $\alpha$ -amilaza,  $\alpha$ -glukozidaza,  $\beta$ -glukozidaza, glukoamilaza, invertaza, maltaza, ksilanaza, pektinaza, fitaza, proteaza, aminopeptidaza i lipaza (Jensen i sur., 2002). S obzirom na činjenicu da *T. lanuginosus* ne producira enzim celulazu, za svoj rast koristi izvore ugljika iz jednostavnih ugljikohidrata. Međutim, u prirodnom okruženju *T. lanuginosus* raste zajedno s ostalim prisutnim mikroorganizmima koji produciraju hidrolitičke enzime, cijepaju celulozu na jednostavnije šećere koje *T. lanuginosus* koristi za rast (Gramany i sur., 2015). Od svih enzima koje producira *T. lanuginosus*, najveći značaj imaju enzimi ksilanaza i lipaza.

### 2.3.2. Lipaza iz *Thermomyces lanuginosus*

Lipaza (EC 3.1.1.3) je enzim koji selektivno katalizira reakciju hidrolize triacilglicerola u vodenom mediju. Zbog stabilnosti u širokom temperaturnom i pH rasponu, kompatibilnosti s organskim otapalima, mogućnosti imobilizacije i ponovne upotrebe te širokoj supstratnoj specifičnosti, lipaze se ističu kao dominantna skupina biokatalizatora (Salihu i Alam, 2015; Girelli i Chiappini, 2023). Iz navedenih razloga, lipaza je enzim koji se koristi kao biokatalizator u širokom spektru biotransformacija, uključujući sektore prerade mlijeka, pekarstva, celuloze i papira, polimera, deterdženata, kože, kozmetike, organske sinteze i gospodarenja otpadom (Singh i sur., 2016).

Struktura lipaze (**Slika 10**) sastoji se od  $\alpha$ -uzvojnice (oblik spiralne prostorne strukture polipeptidnog lanca proteina) i  $\beta$ -nabrane ploče (nastala međusobnim povezivanjem vodikovim vezama dvaju ili više istegnutih lanaca preko karbonilnih i amidnih skupina) (Fischer i Pleiss, 2003). Aktivno mjesto lipaze sastoji se od katalitičke trijade. Katalitičku trijadu čine serin kao

nukleofil, te kiselinasti ostatak koji može biti asparaginska kiselina ili glutaminska kiselina te histidina (Casas-Godoy i sur., 2012). Budući da se trodimenzionalna struktura lipaze razlikuje u ovisnosti od njezina porijekla (biljna, životinjska, humana, fungalna, bakterijska lipaza), kod većine do sad definiranih trodimenzionalnih struktura uočen je hidrofobni polipeptidni lanac (Khan i sur., 2017). Hidrofobni lanac se nalazi iznad aktivnog mjesta lipaze te izolira katalitičku trijadu od reakcijskog medija. Kada se enzim lipaza nalazi u vodenom mediju u kojemu su disperzirane micide ulja, odnosno kad se hidrofobni lanac lipaze nađe na granicama faza između vode i ulja, dolazi do konformacijske promjene trodimenzionalne strukture lipaze. Time aktivno mjesto postaje izloženo reakcijskom mediju i formira se enzim-supstrat kompleks čime započinje katalitički ciklus. Iz navedenog razloga, enzim lipaza ne prati klasičnu Michaelis-Menteničinu kinetiku.



**Slika 10.** Komisijski broj lipaze (EC: Enzyme Commission Number) i 3D struktura *Thermomyces lanuginosus* lipaze<sup>5</sup>

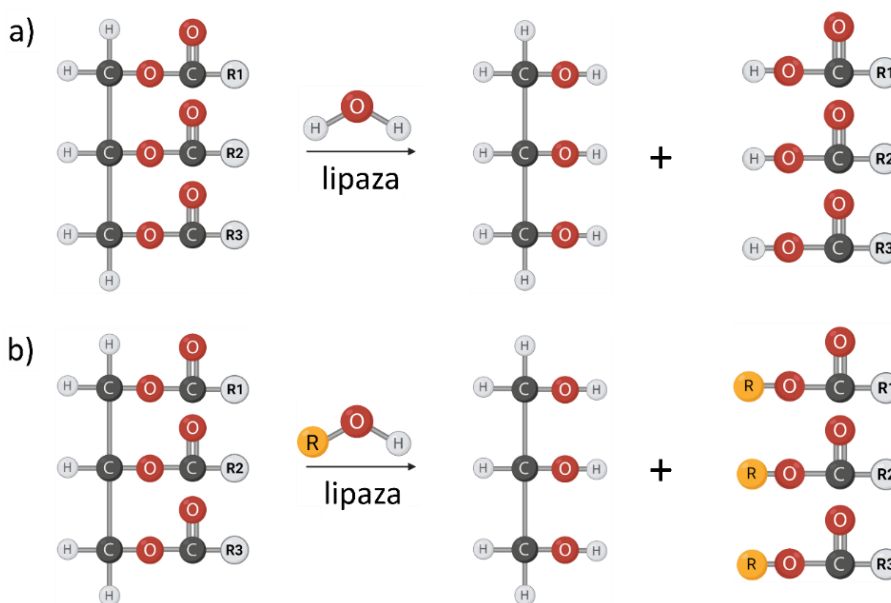
### 2.3.3. Biotransformacije katalizirane lipazom

Industrijska sinteza željenih produkata uglavnom se temelji na upotrebi kemijskih katalizatora kao što su mineralne kiseline, lužine i metalni alkoksidi. Dok upotreba kemijskih katalizatora rezultira visokom konverzijom supstrata u željeni produkt i takvi su industrijski procesi ekonomski opravdani, odvajanje sintetiziranog produkta od katalizatora i/ili neželjenih nusproizvoda predstavlja izazov. Uklanjanje kemijskih katalizatora i produkata zahtijeva dodatne korake pročišćavanja, što u konačnici dovodi do dodatne potrošnje kemikalija i energije. Cjelokupna proizvodnja možda jeste ekonomski isplativa, ali dovodi se u pitanje dugoročne održivosti i negativnog okolišnog utjecaja (Sheldon, 2017; Sheldon, 2018).

<sup>5</sup> Struktura lipaze preuzeta sa web izvora: <https://www.rcsb.org/>

Razvoj širokog spektra održivih industrijskih procesa temeljenih na načelima zelene kemije dovodi do zamjene kemijskih katalizatora ekološki prihvatljivom alternativom: enzimima. Sinteze katalizirane enzimima imaju velike prednosti u odnosu na kemijske sinteze, kao što su visoki prinos, visoka selektivnost, prihvatljivost za okoliš i mogućnost katalize u blagim reakcijskim uvjetima, što također utječe na ekonomski aspekt biokatalitičkog procesa (Schmid i sur., 2001).

Godišnji prihodi tržišta enzima na globalnoj razini kreće se u rasponu od 7 milijardi američkih dolara (Arbige i sur., 2019). Najveća ekonomska dobit temelji se na primjeni amilolitičkih enzima i proteaza, dok je primjena enzima lipaze zauzela treće mjesto na globalnom tržištu. Na temelju ekonomske procjene, očekuje se da će međunarodno tržište lipaze prijeći 797,7 milijuna američkih dolara do 2025., uz porast od 6,2% ukupne godišnje stope rasta od 2017. do 2025., kao odraz primjene lipaze u raznim interdisciplinarnim područjima i industrijskoj proizvodnji (Fatima i sur., 2021) zato što lipaza pokazuje široku supstratnu specifičnost te je kombinacijom različitih elektrofila i nukleofila (supstrata) moguće sintetizirati široki spektar različitih produkata (**Slika 11**).



**Slika 11.** Biotransformacija<sup>6</sup> triacilglicerola pomoću lipaze u reakcijama hidrolize (a) i transesterifikacije (b)

### 2.3.3.1. Enzimski katalizirana hidroliza esterske veze

Lipaza je enzim čija je osnovna biokemijska karakteristika kataliza hidrolize esterske veze u molekuli triacilglicerola. U ovisnosti o načinu cijepanja/hidrolize masnih kiselina u molekuli triacilglicerola, razlikuju se tri osnovne kategorije lipaza. U prvu kategoriju pripadaju lipaze koje se

<sup>6</sup> Za izradu shematskog prikaza korišten program BioRender (<https://app.biorender.com/>)



nazivaju nespecifične lipaze. Takve lipaze kataliziraju reakciju hidrolize masnih kiselina s molekule glicerola neovisno o tome preko kojega su ugljikova atoma vezane za glicerol, pri čemu kao produkti nastaju slobodne masne kiseline i glicerol. Primjenom takvih lipaza, moguća je potpuna hidroliza ulja (Ferreira-Dias i sur., 2013). U drugu skupinu pripadaju lipaze koje kataliziraju reakciju hidrolize masnih kiselina povezanih esterskom vezom za prvi i treći ugljikov atom molekule glicerola te nemaju sposobnost direktne hidrolize masne kiseline s drugog ugljikova atoma molekule glicerola. Takve lipaze zovu se *sn*-1,3-specifične lipaze (Gao i sur., 2020). U treću skupinu pripadaju lipaze koje mogu hidrolizirati samo specifične masne kiseline dugog lanca s *cis*-dvostrukom vezom između C-9 i C-10 atoma (Kapoor i Gupta, 2012). S obzirom na navedene činjenice, lipaze mogu sudjelovati u velikom broju reakcija modifikacija ulja.

Odabirom odgovarajućih triacilglicerola te njihovom selektivnom hidrolizom moguće je provesti sintezu visokovrijednih i esencijalnih mono- i diacilglicerola (poput omega-3-glicerida) (Morales-Medina i sur., 2018). Znanstveno je dokazano da omega-3-gliceridi imaju pozitivni utjecaj na ljudsko zdravlje (sprječavaju kardiovaskularne bolesti, Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest) te se lakše apsorbiraju i metaboliziraju od triacilglicerola (Gunathilake i sur., 2021). Primjerice, u istraživanju provedenog od grupe autora Akanbi i sur. (2013) termofilna fungalna lipaza iz *T. lanuginosus* korištena je za selektivnu hidrolizu ulja incuna. Nakon optimizacije reakcijskih uvjeta postignuta je hidroliza ulja za 60%, uz koncentriranje esencijalne omega-3 masne kiseline DHA za 24%.

Osim hidrolize esterske veze u molekuli triacilglicerola, lipaza može katalizirati estersku vezu u drugim molekulama estera. Astaksantin je derivat karotenoida prirodno prisutan u mikroalgama, vodenim životinjama i kvascima. Istraživanja su pokazala da astaksantin ima jako antioksidativno djelovanje, >100 puta jače od vitamina E, te 6000 puta jača od vitamina C (Zhao i sur., 2019). Međutim, astaksantin se u prirodi pojavljuje u esterificiranom obliku (5% slobodni oblik, 95% esterificiran oblik) te je njegova aktivnost daleko manja od aktivnosti slobodnog astaksantina. Komercijalna priprema slobodnog oblika astaksantina podrazumijeva hidrolizu esterske veze metodom kemijske saponifikacije pri čemu dolazi do generiranja nepoželjnih nusprodukata. Primjenom lipaze kao biokatalizatora moguće je provesti reakciju hidrolize esterske veze na ekološki i ekonomski prihvatljiv način. Vodeći se navedenim činjenicama, uspješno je provedena hidroliza estera astaksantina iz ulja mikroalge *Haematococcus pluvialis* katalizirana lipazom u mikroreaktoru (Mei i sur., 2020). Korišteni mikroreaktorski sustav sastoji se od "T" spojnice koja generira segmentirano strujanje vodene faze (enzim u puferu) i uljne faze, mikrokanala od nehrđajućeg čelika, dvije pumpe i regulatora temperature. Primjenom navedenog

mikroreaktorskog sustava, esteri astaksantina u ulju *H. pluvialis* učinkovito su hidrolizirani do astaksantina pomoću lipaze iz *Aspergillus niger*. Nakon hidrolize, sadržaj slobodnog astaksantina u ulju *H. pluvialis* iznosio je 18,8 mg/dm<sup>3</sup>, 7,83 puta više nego prije hidrolize (2,13 mg/dm<sup>3</sup>) (Mei i sur., 2020). Ovi rezultati pokazuju da se mikroreaktorski sustavi i segmentirani tok strujanja mogu primijeniti i za proizvodnju slobodnog astaksantina iz njegovih estera, odnosno u reakciji hidrolize esterske veze hidrofobnih molekula.

### 2.3.3.2. Enzimski katalizirana sinteza jednostavnih estera

Osim reakcije hidrolize, lipaze mogu katalizirati reakcije esterifikacije i transesterifikacije u reakcijskom mediju koji sadrži malu količinu vode. Budući da su navedene reakcije reverzibilne, odnosno u prisutnosti vode dolazi do povratne reakcije (hidroliza estera), reakcije esterifikacije se moraju odvijati u sustavima bez ili uz minimalni udio vode. U takvim sustavima često se koriste organska otapala kao reakcijski medij. Navedeni reakcijski uvjeti mogu nepovoljno utjecati na veliki broj enzima (lipaze i esteraze iz različitih izvora) te dovesti do smanjenja njihove katalitičke aktivnosti ili može doći do ireverzibilne inhibicije i denaturacije. Iz navedenih razloga, za biokatalitičku sintezu estera može se koristiti lipaza budući da pokazuje stabilnost u različitim organskim otapalima (Doukyu i Ogino, 2010). Esteri imaju široku primjenu u različitim industrijama (prehrambena, farmaceutska, kozmetička industrija, industrija parfema), te predstavljaju glavne nositelje širokog spektra karakterističnih aroma poput arome šljive (butil-formijat) ili voćnog mirisa s notom ruže i naranče (*n*-oktil-formijat) (Burdock, 2016). Osim što su nositelji arome, u industrijskoj sintezi jednostavni esteri mogu se koristiti kao zelena otapala, prekursori u proizvodnji tekstila, emulgatora i polimernih plastifikatora (Jaiswal i Rathod, 2018).

Jedan od primjera sinteze nositelja voćne note manga i banane etil-butirata proveden je od grupe autora Paludo i sur. (2015). U istraživanju je ispitan utjecaj različitih procesnih uvjeta (udio enzima, koncentracija reaktanata te njihovog molarnog omjera, i temperature) na ultrazvukom potpomognutu sintezu estera pomoću lipaze iz *T. lanuginosus*. Nakon provedene optimizacije uvjeta sinteze estera postignuta je visoka konverzija od 90% nakon 6 sati sinteze. Provedbom istraživanja sinteze estera butil-kaprilata (ester izraženog voćnog i cvjetnog mirisa) predstavljeni su bitni zaključci prilikom ispitivanja utjecaja dodatka adsorbensa za vodu prilikom sinteze. Istraživanja su pokazala da dodatak adsorbensa za vodu značajno utječe na poboljšanje prinosa sinteze estera (sa 60% na 92%) (Sose i sur., 2017). Primjenom inovativnih metoda inkapsulacije lipaze s ciljem imobilizacije biokatalizatora također su postignute visoke konverzije sinteze industrijski važnih estera kao što su pentil-valerijat, oktil-valerijat, lauril-valerijat (iskorištenje

reakcije > 98%) (Dudu i sur., 2021). Veliki broj primjera sinteze jednostavnih estera samo potvrđuju činjenicu da lipaza pokazuje afinitet prema širokom spektru supstrata te da ima veliku potencijalnu industrijsku primjenu.

#### 2.3.3.3. Enzimski katalizirana sinteza aromatskih estera

Esteri koji u svojoj kemijskoj strukturi sadrže aromatsku komponentu (benzenski prsten) predstavljaju grupu aromatskih estera. Kemijska sinteza ili izolacija aromatskih estera iz prirodnih izvora zahtjeva veliku potrošnju kemikalija za samu proizvodnju ali i tijekom procesa pročišćavanja željene komponente. Iz navedenih razloga dolazi do potrebe razvoja biokatalitičkih procesa sinteze spojeva temeljenih na načelima zelene kemije i biotehnologije (Van Pelt i sur., 2011).

Jedan od primjera aromatskih estera je benzil-butirat, nositelj note voćnog mirisa koji ima primjenu u širokom spektru industrija (kozmetička industrija, u proizvodnji parfema, šampona i sredstava za čišćenje). Primjenu benzil-butirata kao u proizvodnji određenih namirnica namijenjenih za ljudsku prehranu odobrila je Američka Agencija za hranu i lijekove (FDA) (McGinty i sur., 2012). S obzirom na navedene industrijske potrebe za sintezom navedenog estera, razvijeni su i testirani procesni uvjeti sinteze benzil-butirata u šaržnim sustavima primjenom ultrazvuka i enzima lipaza. Postignut je prinos od 99% uz mogućnost primjene imobiliziranog enzima u 5 ciklusa sinteze bez značajnog smanjenja enzimске aktivnosti, odnosno u prinosu sinteze estera (Badgujar i Bhanage, 2015). Nadalje, primjenom imobilizirane lipaze ispitana je mogućnost sinteze aromatskih estera kombinacijom različitih aromatskih alkohola s vinil acetatom kao acil donorom (Dhake i sur., 2011). U navedenom istraživanju, provedena je sinteza aromatskog estera cinamil-acetata (aroma jagode) s iskorištenjem od 99% u 24h, te estera (4-metoksifenil)metil-acetata (99%, 48h). Veliki broj primjera biokatalitičke sinteze aromatskih estera pomoću lipaze s velikim iskorištenjem reakcije značajno doprinose razvoju i razumijevanju biotehnoloških procesa temeljenih na enzimskoj tehnologiji (Badgujar i Bhanage, 2014; Badgujar i sur., 2016).

#### 2.3.3.4. Enzimski katalizirana sinteza estera polifenola

Polifenolni spojevi poznati su prirodni antioksidansi koji, zahvaljujući njihovom kemijskom strukturom, imaju dobre učinke na zdravlje ljudi (Grgić i sur., 2020). Znanstvena istraživanja pokazala su da esterificirani oblici polifenolnih spojeva pokazuju izuzetna bioaktivna svojstva (antivirusna, antikancerogena, antimikrobna, protuupalna svojstva) (Murtaza i sur., 2014). Također, esterifikacijom polifenola poboljšava se njihova bioraspodivnosti i stabilnost (Jokioja i sur., 2021). Sintaza estera polifenola može se provesti kemijskim putem. Međutim, kemijska

sinteza zahtjeva provođenje procesa pri povišenim temperaturama što može dovesti do degradacije polifenolnih spojeva što značajno limitira konvencionalnu sintezu estera polifenola. Iz tog razloga, razvijaju se enzimski katalizirani procesi esterifikacije. Primjeri sinteze polifenolnih estera primjenom lipaze uključuju modifikacije širokog spektra spojeva poput cimetine kiseline, narginina, cijanidin-3-glukozida, galne kiseline, hidroksicimetine kiseline, te različitih spojeva iz skupine antocijana (Priya i Chadha, 2003; Stevenson i sur., 2006; Bouaziz i sur., 2010; Fernandez-Aulis i sur., 2020; Marathe i sur., 2021; Suárez-Escobedo i Gotor-Fernández, 2021).

#### 2.3.3.5. Enzimski katalizirana sinteza estera ugljikohidrata

Enzimskim modifikacijama jednostavnih šećera reakcijom esterifikacije s masnim kiselinama nastaju neionski biorazgradivi surfaktanti. Budući da odlikuju određenim svojstvima poput netoksičnosti te su bez mirisa i okusa, navedeni surfaktanti mogu se koristiti u širokom spektru industrija. Također, dokazano je da imaju određena antitumorska i antimikrobna svojstva što im daje veliku prednost u odnosu na kemijske konvencionalne surfaktante za primjenu u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Casas-Godoy i sur., 2016). Neki od primjera sinteze estera jednostavnih ugljikohidrata obuhvaćaju reakcije esterifikacije glukoze, fruktoze, laktoze, ksiloze i saharoze sa miristinom, oleinskom i palmitinskom kiselinom (Cauglia i Canepa, 2008; Neta i sur., 2012; Gonçalves i sur., 2021). Istraživanja su pokazala dobre rezultate u pogledu prinosa reakcije te je dokazana prednost primjene enzimске tehnologije u odnosu na kemijski kataliziranu sintezu estera. Regioselektivno aciliranje šećera može imati značajan utjecaj na sintezu surfaktanata, zaslađivača, emulgatora i kemijskih ili farmaceutskih intermedijera. Osim toga, otapala koja mogu otopiti i šećere i korištene elektrofile uključuju dimetil sulfoksid (DMSO), piridin i dimetilformamid, ali ta otapala često inaktiviraju enzim i nekompatibilna su s primjenom u prehrambenoj industriji. Iz navedenih razloga, ispitana je mogućnost sinteze derivata šećera u reakciji transesterifikacije s vinil palmitatom. U tu svrhu, korišten je protočni kontinuirani mikroreaktorski sustav s imobiliziranom lipazom iz *T. lanuginosus* (Lipozyme TL IM). Optimiranjem reakcijskih uvjeta, provedena je sinteza estera šećera u vremenu zadržavanja od 30 minuta, osiguravajući izvrsnu čistoću (95% – 99%) i visoke prinose (82% – 98%) izoliranog proizvoda (Du i Luo, 2012).

Nadalje, modifikacija polisaharida poput škroba provedena je pomoću *Candida antarctica* lipaze esterifikacijom s palmitinskom kiselinom (Wang i sur., 2014). Cilj navedenog istraživanja bio je predložiti reakcijski mehanizam i razviti matematički model za reakciju sinteze modificiranog škroba. Nakon optimizacije reakcijskih uvjeta, maksimalna konverzija palmitinske kiseline bila je

70% nakon 4 sata reakcije, a predloženi model pokazao je dobra slaganja s eksperimentalnim rezultatima.

### **2.3.4. Metode pročišćavanja lipaze**

Industrijska primjena biokatalizatora je ograničena zbog problematike koja se javlja prilikom uvećanja mjerila na industrijsku razinu. Primjerice, provedbom šaržne sinteze željenog spoja pomoću enzima u dvofaznim sustavima (sustavi u kojima je enzim pripremljen u vodenoj fazi, a supstrati u organskoj fazi različite polarnosti) najčešće rezultira nemogućnošću separacije dviju faza i učinkovite izolacije produkta uslijed formiranja emulzije. Navedena tvrdnja proizlazi kao posljedica primjene veće količine enzima tijekom sinteze budući da enzimi kao proteinske molekule imaju svojstva emulgatora. Osobito kada se enzimi koriste u obliku sirovih ekstrakata, dobivenih ekstrakcijom nakon fermentacije, koji sadrže druge kontaminirajuće proteine (Adebar i sur., 2019).

Iako je razvoj novih bioindustrijskih procesa temeljenih na enzimskoj biokatalizi ograničen zbog cijene enzima (Budžaki i sur., 2018b), sve je više istraživanja usmjereno prema razvoju održivih procesa proizvodnje biokatalizatora iskorištavanjem industrijskog otpada i/ili nusprodukata te imobilizacijom lipaze (Salgado i sur., 2021). Proces imobilizacije lipaze nerijetko zahtjeva visoki stupanj čistoće proteina što utječe na ekonomsku isplativost biokatalitičkog procesa zbog kompleksnih postupaka pročišćavanja sirovog ekstrakta enzima. Napose ako se za imobilizaciju koriste nepročišćeni enzimi dobiveni uzgojem mikroorganizama na biološkim supstratima, čiji je kemijski sastav kompleksan. Međutim, dodavanjem soli poput amonijeva sulfata ili organskih otapala (acetona, etanola) koja se miješaju s vodom ili neionskih polimera (polietilen glikol) u vodene ekstrakte, dolazi do taloženja proteina kao fizičkih agregata proteinskih molekula, međusobno povezanih nekovalentnim vezama bez narušavanja tercijarne strukture i denaturacije enzima (Tan i sur., 2015). Naknadno umrežavanje nastalih proteinskih agregata (primjerice pomoću glutaraldehida) čini ih trajno netopljivima u vodi uz očuvanje enzimске aktivnosti. Navedene karakteristike enzima dovele su do razvoja nove tehnologije za imobilizaciju enzima takozvanih unakrsno povezanih enzimskih agregata (cross-linked enzyme aggregates, CLEA®). CLEA® tehnologija u suštini kombinira pročišćavanje i imobilizaciju u jednu operaciju koja ne zahtijeva enzimski pripravak visoke čistoće. Na primjer, može se koristiti za izravnu imobilizaciju enzima iz sirovog ekstrakta nakon procesa fermentacije i proizvodnje lipaze. Osim poboljšane stabilnosti tijekom skladištenja, prednost CLEA® tehnologije je što dobiveni enzimski agregati imaju bolju operativnu stabilnost tijekom biotransformacije pri povišenim temperaturama i prisutnosti

organskih otapala te su otporni na ispiranje u vodenom mediju. CLEA® tehnologija izvrsna je metoda za stabilizaciju kvaternarne strukture enzima, koji mogu postojati kao dimeri ili monomeri, što je strukturna značajka mnogih industrijski važnih enzima (Sheldon i van Pelt, 2013). Iz navedenih razloga, u idućim poglavljima opisane su metode te pregled relevantnih rezultata pročišćavanja lipaze precipitacijom pomoću soli i organskih otapala.

#### 2.3.4.1. Pročišćavanje lipaze precipitacijom pomoću soli

Jedna od najčešće korištenih metoda za pročišćavanje i frakcioniranje proteina je njihovo taloženje uz dodatak anorganskih soli. Amonijev sulfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , često se koristi za taloženje proteina iz vodenih otopina (isoljavanje proteina) zbog visoke topljivosti i mogućnosti pripreme vodene otopine visoke ionske jakosti, niske cijene i komercijalne dostupnosti soli visoke čistoće. Osim toga, ioni  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{SO}_4^{2-}$  su na kraju Hofmeisterova niza (poboljšavaju isoljavanje proteina) te se pokazalo da stabiliziraju strukturu proteina (Duong-Ly i Gabelli, 2014). Hofmeisterov niz određuje relativni utjecaj iona na fizikalna svojstva i karakteristike vodenih otopina kao što su koloidno povezivanje i savijanje proteina (Zhang i Cremer, 2006).

Topivost proteina u otopinama ovisi o ionskoj jakosti otopine (koncentraciji otopljenih soli), polaritetu otapala, pH i temperaturi te strukturi proteinske molekule (omjerima i položaju hidrofilnih i hidrofobnih aminokiselina u proteinu). Na topljivost ili precipitaciju proteina prvenstveno utječu interakcije protein-otapalo i protein-protein. Povećanje interakcije protein-otapalo povećava se topljivost proteina. Postoje tri glavne interakcije protein-voda: hidratacija iona bočnih lanaca aminokiselina (asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, lizin), vodikova veza između polarnih skupina i vode (serin, treonin, tirozin) i hidrofobna hidratacija (valin, izoleucin, leucin, fenilalanin) (Wingfield, 2016).

Dodatkom i disocijacijom soli u vodi dolazi do vezanja iona ionskim vezama za kisele i bazične skupine bočnih ogranaka aminokiselina na površini proteina. Pri niskim koncentracijama soli povećava se topljivost proteina u vodenim otopinama jer se ioni soli vezani na proteine vežu na molekule vode i povećavaju hidratacijski sloj oko molekule proteina. Kao rezultat toga, interakcija protein-protein se smanjuje, a interakcija protein-otapalo se povećava. Topivost proteina u vodenoj otopini raste sve dok se ne postigne koncentracija soli u kojoj su svi ioni (nastali disocijacijom soli) vezani za slobodne naboje na površini proteina. Kako se koncentracija soli u vodi povećava, topljivost proteina se smanjuje jer slobodni ioni soli u otopini (kao jači elektroliti) vežu slobodne molekule vode iz hidratacijskog sloja oko proteina. Ovo smanjuje interakcije

protein-otapalo i povećava interakcije protein-protein. Kao rezultat toga, smanjuje se topljivost i dolazi do taloženja proteina (Moon i sur., 2000). Na taloženje proteina dodavanjem soli izravno utječe pH otopine budući da topljivost proteina ovisi o pH otopine. Najniža topljivost proteina javlja se pri pH kod kojeg je zbroj naboja bočnih aminokiselinskih ogranaka jednak nuli, tj. u izoelektričnoj točki proteina (Novák i Havlíček, 2016).

Amonijev sulfat korišten je u procesu pročišćavanja lipaze iz različitih izvora (Shafei i Allam, 2010; Tišma i sur., 2019; Al-Haidari i sur., 2020; Jamilu i sur., 2022; Ali i sur., 2023; Ezenwelu i sur., 2022). Međutim, primarni nedostatak primjene metode isoljavanja za pročišćavanje proteina jeste precipitacija kontaminirajućih proteina s proteinom od interesa. Također, nakon pročišćavanja enzim se nalazi u otopini soli visoke koncentracije za čije je uklanjanje potrebno provesti postupak dijalize. U konačnici, za dobivanje uzorka čistog proteina, neophodno je provesti dodatke korake pročišćavanja kao što je kromatografija ionske izmjene i kromatografija gel filtracije (isključivanjem po veličini) (Duong-Ly i Gabelli, 2014).

#### 2.3.4.2. Pročišćavanje lipaze precipitacijom pomoću organskih otapala

Pročišćavanje lipaze iz sirovog enzimskog ekstrakta može se provesti precipitacijom pomoću organskih otapala koji se miješaju s vodom (metanol, etanol, aceton). Dodatkom organskog otapala u vodenu otopinu proteina dolazi do smanjenja dielektrične konstante vode što rezultira međusobnim približavanjem molekula proteina te u konačnici i njihovom agregacijom. Odnosno, organsko otapalo može postupno istiskivati molekule vode s površine proteina čime se smanjuje hidratacijski sloj vode oko molekule proteina te se oni mogu agregirati privlačnim elektrostatskim silama. Osim vrste otapala, na precipitaciju proteina utječe temperatura, pH i koncentracija proteina (Novák i Havlíček, 2016).

U istraživanju provedenog od grupe autora Cao i sur. (2012) provedena je precipitacija lipaze LC2-8 iz *Pseudomonas stutzeri* postupnim dodavanjem hladnog acetona do volumnog udjela acetona od 60% (faktor pročišćavanja iznosio je 2,9). Nakon precipitacije, proteini su izolirani centrifugiranjem. Dodatno pročišćavanje provedeno je primjenom kromatografije anionske izmjene. Na isti način, provedeno je pročišćavanje lipaze iz *Bacillus subtilis* (Shah i Bhatt, 2012) dok je zaostali aceton iz precipitata uklonjen sušenjem u vakuum sušioniku. Iako primjena organskih otapala u procesu pročišćavanja lipaze ima velikih prednosti u odnosu na precipitaciju pomoću soli (jednostavnija separacija proteina od precipitanta, tj soli ili otapala), organska otapala ne djeluju selektivno na taloženje proteina kao što je to u slučaju primjene amonijeva sulfata. Osim proteina, primjena acetona može utjecati na taloženje i drugih komponenti iz sirovog ekstrakta

poput ugljikohidrata (Abbou i sur., 2019). Također, prilikom pročišćavanja enzima primjenom organskih otapala bitno je poznavati toksikologiju primijenjenog organskog otapala te njegov mogući inhibicijski učinak na enzim (Kumar i sur., 2016).

## 2.4. PROCJENA ODRŽIVOSTI BIOTEHNOLOŠKIH PROCESA

Jedan od glavnih ciljeva razvoja biorafinerije jeste postupna zamjena eksploatacije fosilnih izvora ugljika na održivu proizvodnju biogoriva i drugih bioproizvoda iz obnovljivih izvora ugljika (Bórawski i sur., 2019). Lignocelulozna biomasa, kao prirodna sirovina s nultom emisijom ugljika (ugljična neutralnost), postala je visokovrijedna sirovina za održivu proizvodnju bioprodukata te ju nije moguće zamijeniti drugim obnovljivim izvorima energije. Međutim, održiva proizvodnja bioprodukata iz lignocelulozne biomase uvelike ovisi o dostupnosti resursa, njihovim učinkovitim ili čak industrijski održivim procesima konverzije i vremenu obnavljanja sirovina (Mika i sur., 2018). Štoviše, ubrzani razvoj velikog broja metoda konverzije lignocelulozne biomase na principima biorafinerije zahtjeva procjenu njihove održivosti i učinkovitosti. Dijagram *ChemistTREE*, temeljen na 12 principa „Zelene kemije“ može služiti kao alat za razvoj strategije unaprijedena održivosti procesa. Međutim, ne postoji niti jedna metrika koja može obuhvatiti sve aspekte „Zelene kemije“ i stoga je važno da se izbor metrike(a) temelji na kontekstu namjeravane evaluacije (Erythropel i sur., 2018).

Prvi indeks „Zelene kemije“, *E-faktor*, definiran je 1990. kao mjera učinkovitosti procesa. *E-faktor* definira ukupne kvantitete proizvedenog otpada na svaki kg željenog produkta. Drugi indeksi temeljeni na bilanci mase kao što su *MI* (engl. *mass intensity*) i *PMI* (engl. *process mass intensity*) etablirani su u poticanju učinkovitog iskorištavanja resursa i minimiziranju otpada (Sheldon, 2017, 2018). Treba akcentirati da jedinstveni indeks održivosti ne postoji jer se ekspertiza mora oslanjati na termodinamičkim i ekonomskim aksiomima te mora biti koherentna i mjerljiva (Sheldon, 2018). Nadalje, *E-faktor*, *MI* i *PMI* ne uključuje karakteristike i utjecaj produkta i/ili nastalog otpada na okoliš, što znači da proces valorizacije biomase treba ocijeniti procjenom životnog ciklusa (LCA) (Escobar i Laibach, 2021). Ipak, implementacija citiranih metrika temeljenih na bilanci mase može poslužiti kao obećavajući alat u ocjeni održivosti ne samo cjelokupnog procesa, nego svake pojedine faze u procesu konverzije biomase. Time je moguće procijeniti koja od pojedinih faza najviše utječe na održivost procesa (u vidu generiranja otpada), čime je moguće u ranim fazama razvoja biorafinerije unaprijediti proces.



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

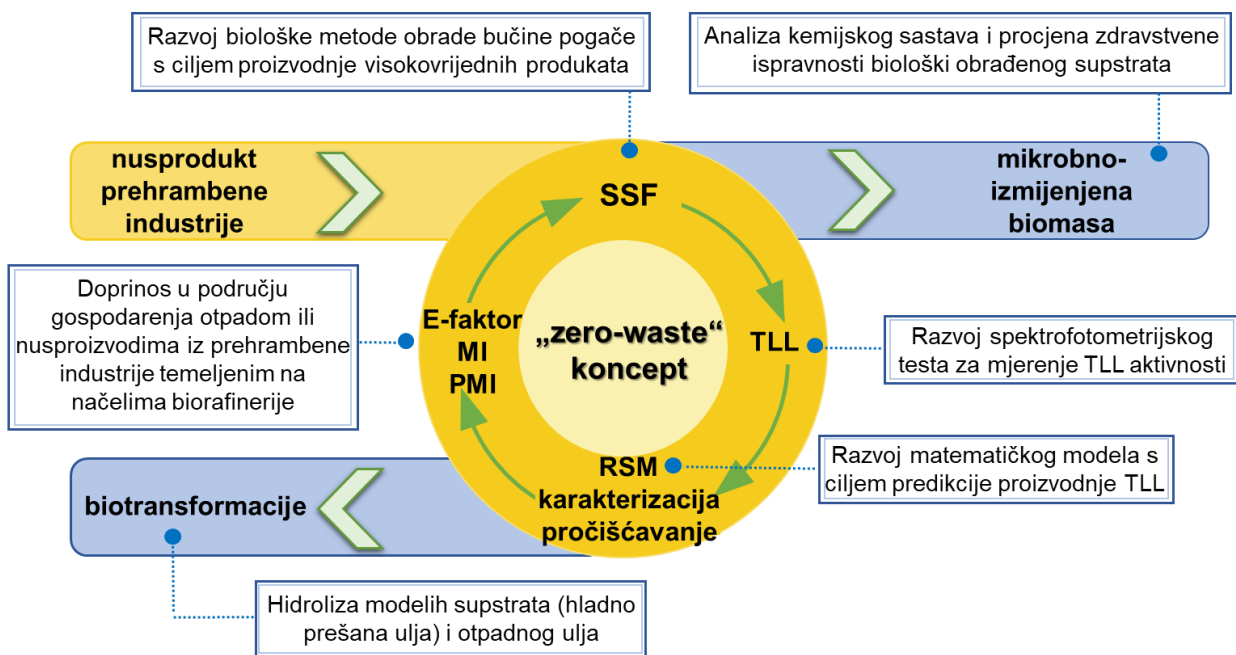
Glavni cilj ovog rada bio je razvoj biološke metode obrade bučine pogače u svrhu proizvodnje enzima lipaza i poboljšanja kvalitete bučine pogače.

Hipoteza istraživanja:

Biološkom obradom bučine pogače s *T. lanuginosus* moguće je, na ekonomski i ekološki prihvatljiv način, proizvesti ekstrakt enzima lipaza koji ima visoku operativnu stabilnost i široku supstratnu specifičnost te se zbog toga može primjenjivati kao biokatalizator u različitim biotransformacijama. Ostatak nakon ekstrakcije lipaze predstavlja nutritivno obogaćen materijal s mogućnošću primjene u proizvodnji stočne hrane, biognojiva ili biogoriva.

Kako bi se postigli postavljeni ciljevi i testirala hipoteza, pojedinačni zadaci predloženog istraživanja bili su:

- Razvoj brzog spektrofotometrijskog testa za mjerenje početne reakcijske brzine hidrolize esterske veze pomoću lipaze iz *T. lanuginosus*;
- Određivanje kemijskog sastava pogače buče, nusproizvoda procesa proizvodnje hladno prešanog ulja;
- Optimiranje procesnih uvjeta fermentacije na čvrstim nosačima metodom odzivnih površina s ciljem proizvodnje lipaze visoke volumne aktivnosti;
- Karakterizacija sirovog ekstrakta lipaze;
- Pročišćavanje lipaze;
- Biotransformacija biljnih ulja katalizirana sirovom i djelomično pročišćenom lipazom;
- Biotransformacija otpadnog ulja katalizirana djelomično pročišćenom lipazom;
- Određivanje kemijskog sastava pogače buče nakon biološke obrade pomoću *T. lanuginosus*;
- Procjena održivosti procesa ("Green Metrics").



Slika 12. Shematski prikaz provedenog istraživanja

## 3.2. MATERIJALI I METODE

### 3.2.1. Kemikalije

Popis kemikalija korištenih tijekom provedbe eksperimentalnog dijela doktorskog rada:

- *Acros Organics (Geel, Belgija)*: 3,4-Dihidroksibenzojeva kiselina (97%), 3,5-dinitrosalicilna kiselina (98%), amonij sulfamat, bakrov (II) klorid dihidrat, bakrov(II)sulfat (98%), cinkov klorid, D(-)-fruktoza (99%), D(+)-saharoza (99%), D-glukozamin hidroklorid (98+%), heksadeciltrimetil amonijev bromid (CTAB), kvercetin hidrat (95%), natrijev borat dekahidrat, natrijev dodecil sulfat (SDS) (85%), natrijev fosfat dibazni bezvodni, natrijev fosfat monobazni monohidrat, natrijev lauril sulfat neutralni, PEG 6000, trolox (97%), Tween 40, vanilinska kiselina (97%).
- *Alfa Aesar (Saint Louis, SAD)*: *p*-Nitrofenil palmitat (*p*NP-palmitat).
- *Alfa Aesar GmbH & Co KG (Kandel, Njemačka)*: Aluminijev klorid heksahidrat.
- *Biolife Italiana Sr. L. Viale Monza (Milan, Italija)*: Krumpirov agar (PDA).
- *Extrasynthese (Genay, Francuska)*: Procijanidin B1, procijanidin B2.

- *Fisher Chemical (Loughborough, Ujedinjeno Kraljevstvo)*: Bromfenolplavo, kloroform, natrijev-kalijev tartarat tetrahidrat.
- *Fisher Scientific (Crawley, Ujedinjeno Kraljevstvo)*: 2-Etoksietanol, Triton X-100.
- *Fluka (Milwaukee, Wisconsin, SAD)*: Coomassie Brilliant Blue G-250.
- *Fluka Chemie GmbH (Buchs, Švicarska)*: Tween 80.
- *Gram Mol d.o.o. (Zagreb, Hrvatska)*: Aceton (p.a.), D(+)-glukoza bezvodna, DMSO, etanol (96%, p.a.), fenolftalein, kalijev hidroksid (perle), klorovodična kiselina (ampula, 0,1 mol/dm<sup>3</sup>), L-(+)askorbinska kiselina, natrijev hidrogenfosfat dihidrat, natrijev hidroksid (1 mol/dm<sup>3</sup>, p.a.), natrijev hidroksid (ampula, 0,1 mol/dm<sup>3</sup>), natrijev karbonat bezvodni (p.a.), natrijev klorid (p.a.), natrijev nitrit, natrijev sulfat bezvodni.
- *J. T. Baker (Arnhem, Nizozemska)*: Izopropanol (HPLC čistoće), acetonitril (HPLC čistoće), metanol (HPLC čistoće).
- *Kemika (Zagreb, Hrvatska)*: Barijev klorid dihidrat, cinkov sulfat heptahidrat, Folin-Ciocalteu reagens, kalijev klorid, octena kiselina (ledena, 99,5%), sumporna kiselina (95 – 98%).
- *Liofilchem (Roseto degli Abruzzi TE, Italija)*: Ekstrakt kvasca.
- *Sigma-Aldrich (Beč, Austrija)*: 2-Etoksietanol, glicin (99%), goveđi serumski albumin (96%), klorovodična kiselina (37%), magnezijev sulfat (99%), manganov sulfat monohidrat (98%), *N*-acetil-D-glukozamin (≥99%), sephadex G-100, *Thermomyces lanuginosus* lipaza (Lipolase 100 L; ≥100000 U/g), β-merkaptioetanol.
- *Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, SAD)*: (-)-Epikatehin, (+)-katehin hidrat (98%), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal, DL-arabinoza, epikatehin galat (98%), elaginska kiselina, ergosterol, ferulinska kiselina (99%), galna kiselina monohidrat (98+% A.C.S. reagent), galokatehin galat, kaempferol, kafeinska kiselina, natrijev sulfit, *n*-oktanol (99%), *o*-kumarinska kiselina, *p*-hidroksibenzojeva kiselina (99%), *p*-kumarinska kiselina, rutin hidrat, siringinska kiselina (95%).
- *Sigma-Aldrich (Steinheim am Albuch, Njemačka)*: Triton X-45, Span 80, guma arabika.
- *T.T.T., d.o.o. (Sveta Nedjelja, Hrvatska)*: Etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol dihidrat (EDTA, Kompleksal III).
- *Thermo Fisher Scientific™ (Waltham, Massachusetts)*: Proteinski markeri PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa.
- *VWR BDH Prolabo Chemicals (Harlow, Ujedinjeno Kraljevstvo)*: 1,4-Dioksan, PEG 4000, Tween 20.
- *VWR Chemicals (Leuven, Belgija)*: Tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS) (99%).

- *VWR Chemicals (Lutterworth, Ujedinjeno Kraljevstvo): n*-Heksan (HPLC čistoće), heptan, toluen, željezo (III) klorid heksahidrat.

### 3.2.2. Uređaji

Popis uređaja korištenih prilikom izrade eksperimentalnog dijela doktorskog rada:

- Analizator ugljika i dušika (TOC-L<sub>CPH/CPN</sub>, SSM 5000A, Shimadzu, Japan),
- Autoklav (TIP 7510945, Sutjeska, Beograd, Srbija),
- Bioreaktor s pliticama (Euclid d.o.o., Vinkovci, Hrvatska),
- Inkubator (KB 115, BINDER GmbH, Tuttlingen, Njemačka),
- Jedinica za destilaciju uzoraka Kjeldahl (Gerhard, Vapodest 1, Königswinter, Njemačka),
- Jedinica za digestiju uzoraka Kjeldahl (Behr Labor-Tecnik, Behrotest K12, Düsseldorf, Njemačka),
- Laboratorijski rotacijski vakuum uparivač (Büchi, Rotavapor® R-210, Flawil, Švicarska),
- Laboratorijski ultracentrifugalni mlin (Retsch ZM200, Haan, Njemačka),
- Liofilizator (Martin Christ, Alpha 2-4 LSCplus i CRV PRO 4, Osterode am Harz, Njemačka),
- Orbitalna tresilica (PSU-10i, Orbital shaker, Biosan, SAD),
- pH-metar (HI 2211 pH/ORP Meter, Hanna instruments, Zagreb, Hrvatska),
- Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC Nexera XR, Shimadzu, Kyoto, Japan),
- Ultrazvučna kupelj (Elmasonic P 120H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen (Hohentwiel) Njemačka),
- Univerzalni sustav za ekstrakciju (Büchi, B-811 LSV, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska),
- Uređaj za određivanje sirovih vlakana (FIWE 3, VELP Scientifica, Usmate Velate, Italija),
- Uređaj za radijacijsko-infracrveno sušenje (HR-73, Mettler Toledo, Zürich, Švicarska),
- UV–VIS spektrofotometar (UV-1280, Shimadzu, Japan),
- Vakuum sušionik (witeg Labortechnik GmbH, WOV Vacuum Oven, Wertheim, Njemačka),

- Vertikalna jedinica za elektroforezu (Mini Vertical Electrophoresis Unit, SE260 Mighty Small II Deluxe, Hoefer, SAD),
- Vodena kupelj s trešnjom (Julabo, SW-23, Seelbach, Njemačka),
- Vrtložna miješalica (Vortex MX-S, DLAB Scientific Co., d.o.o., Peking, Kina),
- Zamrzivač (Freezer SWUF-80 UniFreeze Smart-Lab™ Wertheim, Njemačka).

### 3.2.3. Razvoj brzog spektrofotometrijskog testa za mjerenje početne reakcijske brzine hidrolize esterske veze pomoću lipaze iz *T. lanuginosus*

Iako su testovi za mjerenje hidrolitičke aktivnosti lipaze dostupni u literaturi, reakcijski uvjeti provedbe testa međusobno se znatno razlikuju s obzirom na podrijetlo (biljno, animalno, humano, mikrobn) lipaze. Iz navedenih razloga, u prvom djelu doktorskog rada istraživani su optimalni uvjeti hidrolize *p*NP-palmitata katalizirane komercijalnom lipazom iz *T. lanuginosus* u svrhu razvoja spektrofotometrijskog testa za mjerenje hidrolitičke aktivnosti enzima.

#### 3.2.3.1. Utjecaj početne koncentracije lipaze na hidrolitičku aktivnost

Da bi se ispitao utjecaj koncentracije enzima na hidrolitičku aktivnost, pripremljene su različite početne koncentracije enzima u TRIS-HCl puferu ( $50 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 8$ ) s faktorom razrjeđenja od 500 do 80 000. Emulzija *p*NP-palmitata pripremljena je u TRIS-HCl puferu ( $50 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 8$ ) intenzivnim miješanjem  $0,160 \text{ cm}^3$  otopine supstrata i  $2,840 \text{ cm}^3$  pufera s 0,4% gume arabike. Otopina supstrata u koncentraciji od  $20 \text{ mmol/dm}^3$  pripremljena je u izopropanolu. Nakon pripreme i inkubacije emulzije supstrata na  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , u PMMA kivetu dodano je  $1 \text{ cm}^3$  reakcijske smjese i  $0,01 \text{ cm}^3$  razrijeđene otopine komercijalne lipaze u TRIS-HCl puferu ( $50 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 8$ ). Reakcija hidrolize *p*NP-palmitata provedena je u trajanju od 120 sekundi te je zabilježena promjena apsorbancije u vremenskom intervalu od 60. do 120. sekunde pri valnoj duljini od 440 nm. Volumna aktivnost lipaze ( $r_1$ ), odnosno brzina reakcije hidrolize *p*NP-palmitata katalizirana lipazom (TLL) izračunata je prema formuli (1):

$$r_1 = \frac{V_u \cdot FR}{\varepsilon \cdot d \cdot V_e} \cdot \frac{dA}{dt} \quad (1)$$

gdje je:  $r_1$  = volumna aktivnost enzima [ $\text{U/cm}^3$ ]

$V_u$  = ukupni volumen uzorka u kivetu [ $\text{cm}^3$ ]

FR = faktor razrjeđenja [-]

$V_e$  = volumen enzimskog pripravka [ $\text{cm}^3$ ]

$\epsilon$  = molarni ekstinkcijski koeficijent [ $2,6159 \text{ dm}^3/(\text{mmol cm})$ ]

$d$  = promjer kivete [1 cm]

$dA/dt$  = promjena apsorbancije u vremenu [1/min]

Jedinica aktivnosti enzima (U) definirana je kao količina enzima potrebna da se oslobodi 1  $\mu\text{mol}$  *p*-nitrofenola u trajanju od 1 minute reakcije pri definiranim reakcijskim uvjetima.

### 3.2.3.2. Određivanje molarnog ekstinkcijskog koeficijenta *p*-nitrofenola

U svrhu izračuna molarnog ekstinkcijskog koeficijenta ( $\epsilon$ ) *p*-nitrofenola provedena je hidroliza *p*NP-palmitata na sljedeći način: Otopine supstrata pripremljene su otapanjem različitih koncentracija *p*NP-palmitata (1 – 4  $\text{mmol/dm}^3$ ) u izopropanolu. Emulzija *p*NP-palmitata pripremljena je u TRIS-HCl puferu (50  $\text{mmol/dm}^3$ , pH = 8) intenzivnim miješanjem 0,160  $\text{cm}^3$  otopine supstrata i 2,840  $\text{cm}^3$  pufera s 0,4% gume arabike. Nakon pripreme i inkubacije emulzije supstrata na 35 °C, u PMMA kivetu dodano je 1  $\text{cm}^3$  reakcijske smjese i 0,01  $\text{cm}^3$  razrijeđene otopine komercijalne lipaze u TRIS-HCl puferu (50  $\text{mmol/dm}^3$ , pH = 8). Reakcija hidrolize *p*NP-palmitata provedena je u trajanju od 20 minuta. Nakon provedene kompletne hidrolize supstrata izmjerena je apsorbancija oslobođenog *p*-nitrofenola pri valnoj duljini od 440 nm. Molarni ekstinkcijski koeficijent izračunat je prema formuli (2) za svaku pripremljenu koncentraciju supstrata:

$$\epsilon = \frac{A_{440}}{c_s \cdot d} \quad (2)$$

gdje je:  $\epsilon$  = molarni ekstinkcijski koeficijent [ $\text{dm}^3/(\text{mmol cm})$ ]

$A_{440}$  = apsorbancija izmjerena pri 440 nm [-]

$c_s$  = koncentracija supstrata [ $\text{mmol/dm}^3$ ]

$d$  = promjer kivete [1 cm]

Svi eksperimenti provedeni su u tri paralelna mjerenja. Iz izračunatih vrijednosti molarnog ekstinkcijskog koeficijenta za svaku koncentraciju supstrata, izračunata je srednja vrijednost  $\epsilon$  te je korištena u svrhu izračuna volumne aktivnosti lipaze prema formuli (1).

#### 3.2.3.3. Utjecaj početne koncentracije supstrata na aktivnost lipaze

Utjecaj početne koncentracije *p*NP-palmitata na hidrolitičku aktivnost TLL ispitana je na sljedeći način:

Otopine supstrata pripravljene su otapanjem različitih koncentracija *p*NP-palmitata (0,1875 – 30 mmol/dm<sup>3</sup>) u izopropanolu. Emulzija *p*NP-palmitata pripravljena je u TRIS-HCl puferu (50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH = 8) intenzivnim miješanjem 0,160 cm<sup>3</sup> otopine supstrata i 2,840 cm<sup>3</sup> pufera s 0,4% gume arabike. Volumna aktivnost lipaze mjerena je spektrofotometrijski i izračunata prema prethodno opisanom postupku.

#### 3.2.3.4. Utjecaj pH na aktivnost lipaze

Utjecaj pH (pH 7 – 10) na hidrolitičku aktivnost TLL ispitana je na sljedeći način:

Otopina supstrata u koncentraciji od 10 mmol/dm<sup>3</sup> pripravljena je u izopropanolu. Reakcijska smjesa pripravljena je miješanjem 0,160 cm<sup>3</sup> otopine supstrata i 2,840 cm<sup>3</sup> pufera s 0,4% gume arabike. Korišteni su sljedeći puferi:

- 50 mmol/dm<sup>3</sup> natrij-fosfatni pufer pH 7,
- 50 mmol/dm<sup>3</sup> TRIS-HCl pufer pH 8 – 10.

Koncentracija *p*NP-palmitata u pripremljenim reakcijskim smjesama bila je konstantna i iznosila je 0,53 mmol/dm<sup>3</sup>. Volumna aktivnost lipaze mjerena je spektrofotometrijski i izračunata prema prethodno opisanom postupku. Za svaki pH određen je molarni ekstinkcijski koeficijent prema prethodno opisanom postupku (poglavlje 3.2.3.2.).

#### 3.2.3.5. Utjecaj organskog otapala na aktivnost lipaze

Utjecaj različitih organskih otapala (acetonitril, metanol, izopropanol, etanol, 2-etoksietanol, DMSO, aceton i 1,4-dioksan) na stabilnost reakcijske smjese i na aktivnost TLL ispitan je na sljedeći način:



Otopine supstrata pripremljene su u različitim koncentracijama (8 – 40 mmol/dm<sup>3</sup>) u različitim organskim otapalima. Zatim je pripremljena reakcijska smjesa u TRIS-HCl puferu (50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH = 9) s 0,4% gume arabike tako da je koncentracija supstrata bila konstantna u svim eksperimentima, a udio organskog otapala u reakcijskoj smjesi različit (2 – 10%, v/v). Volumna aktivnost lipaze mjerena je spektrofotometrijski i izračunata prema formuli (1).

### 3.2.3.6. Utjecaj dodatka različitih emulgatora na aktivnost lipaze

S obzirom na to da je za određivanje hidrolitičke aktivnosti TLL korišten supstrat *p*NP-palmitat koji nije topljiv u vodi, ispitan je utjecaj različitih emulgatora (guma arabika, PEG 4000, PEG 6000, Triton X45, Triton X-100, SDS, CTAB, Tween 20, Tween 40, Tween 80 i Span 80) na pripremu stabilne reakcijske smjese (emulgiranja nepolarnog supstrata u vodi) te na aktivnost TLL na sljedeći način:

Otopina *p*NP-palmitata (20 mmol/dm<sup>3</sup>) pripremljena je u acetonitrilu. Emulzija supstrata pripremljena je u TRIS-HCl puferu (50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH = 9) intenzivnim miješanjem 0,120 cm<sup>3</sup> otopine supstrata i 2,880 cm<sup>3</sup> pufera s dodanim emulgatorom u različitim koncentracijama (0,05 – 0,5%, w/v). Koncentracija *p*NP-palmitata u pripremljenim reakcijskim smjesama bila je konstantna i iznosila je 0,8 mmol/dm<sup>3</sup>. Volumna aktivnost lipaze mjerena je spektrofotometrijski i izračunata prema formuli (1).

### 3.2.3.7. Procjena kinetičkih parametara hidrolize *p*NP-palmitata pomoću lipaze

Emulzija supstrata pripremljena je u TRIS-HCl puferu (50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH = 9) intenzivnim miješanjem 0,120 cm<sup>3</sup> otopine supstrata i 2,880 cm<sup>3</sup> pufera s 0,3% gume arabike. Reakcijska smjesa inkubirana je 1 minutu na 35 °C u ultrazvučnoj kupelji pri djelovanju ultrazvuka frekvencije 35 kHz i jačine rada od 100%. Otopina supstrata pripremljena je otapanjem različitih koncentracija *p*NP-palmitata (1 – 40 mmol/dm<sup>3</sup>) u acetonitrilu. Volumna aktivnost lipaze mjerena je spektrofotometrijski i izračunata prema prethodno opisanom postupku.

Brzina reakcije hidrolize *p*NP-palmitata pomoću TLL opisana je pomoću Michaelis-Menteničinog kinetičkog modela (formula (3)) i Hillvog kinetičkog modela (formula (4)):

$$r = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s} \quad (3)$$

$$r = \frac{V_m \cdot c_s^n}{K_m + c_s^n} \quad (4)$$

gdje je:  $r$  = brzina reakcije [U/cm<sup>3</sup>]  
 $V_m$  = maksimalna brzina reakcije [U/cm<sup>3</sup>]  
 $K_m$  = Michaelisova konstanta [mmol/dm<sup>3</sup>]  
 $c_s$  = koncentracija supstrata [mmol/dm<sup>3</sup>]  
 $n$  = Hillov koeficijent [-]

Parametri kinetičkog modela procijenjeni su nelinearnom regresijskom analizom eksperimentalnih podataka primjenom metode najmanjih kvadrata implementirane u programskom paketu SCIENTIST (MicroMath Scientist 3.0 MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, UT, SAD). Procijenjeni podaci uspoređeni su s eksperimentalnim podacima, te su prema potrebi ponovno izračunati i prilagođeni sve dok nije postignuta minimalna pogreška između eksperimentalnih i procijenjenih vrijednosti. Razlika između vrijednosti eksperimentalnih podataka i procijenjenih pomoću modela je dana kao suma kvadrata odstupanja.

Za razlikovanje dvaju predloženih modela (Michaelis-Menteničin i Hillov model) korišten je kriterij odabira modela (eng. “*model selection criterion*“, MSC) (ugrađen u Scientist). MSC prikazuje “sadržaj informacija” zadanog skupa parametara povezujući koeficijent determinacije s brojem parametara koji su bili potrebni za postizanje prilagodbe. Kada se uspoređuju dva modela s različitim brojem parametara, ovaj kriterij opterećuje model s više parametara. Najprikladniji model bit će onaj s najvećim MSC-om.

#### 3.2.3.8. Test za mjerenje hidrolitičke aktivnosti lipaze

Nakon procjene kinetičkih parametara reakcije hidrolize *p*NP-palmitata pomoću TLL određeni su optimalni reakcijski uvjeti za provedbu testa kako slijedi:

Emulzija supstrata pripravljena je u TRIS-HCl puferu (50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH = 9) intenzivnim miješanjem 0,120 cm<sup>3</sup> otopine supstrata i 2,880 cm<sup>3</sup> pufera s 0,3% gume arabike. Otopina supstrata pripravljena je otapanjem *p*NP-palmitata (10 mmol/dm<sup>3</sup>) u acetonitrilu. Reakcijska smjesa inkubirana je 1 minutu na 35 °C u ultrazvučnoj kupelji pri djelovanju ultrazvuka frekvencije 35 kHz i jačine rada od 100%. Volumna aktivnost lipaze mjerena je spektrofotometrijski i izračunata prema prethodno opisanom postupku.

Definirani test korišten je u daljnjim koracima istraživanja za mjerenje aktivnosti lipaze tijekom procesa proizvodnje, karakterizacije, pročišćavanja i provedbe biotransformacija.

### 3.2.4. Optimiranje procesa proizvodnje lipaze primjenom metode odzivnih površina

#### 3.2.4.1. Supstrat

Bučini peleti, nusprodukt proizvodnje hladno prešanog bučinog ulja (SME Lazić, Vraneševci, Hrvatska), korišteni su kao supstrat za uzgoj radnog mikroorganizma i proizvodnju lipaze. Peleti buče skladišteni su u zamrzivaču na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  te su neposredno prije provedbe eksperimenata usitnjeni na ultracentrifugalnom mlinu na veličinu čestica 1 – 5 mm.

#### 3.2.4.2. Radni mikroorganizam

*Thermomyces lanuginosus* Tsiklinsky (ATCC®76323™) (Leibniz institut DSMZ, Braunschweigu, Njemačka) termofilna kultura uzgajana je na hranjivoj podlozi od krumpirova agara (PDA) uz dodatak 0,5% (w/v) ekstrakta kvasca u inkubatoru deset dana pri  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.4.3. Eksperimentalna matrica i optimiranje procesa proizvodnje lipaze

U ovom radu metoda odzivnih površina (RSM) korištena je za procjenu utjecaja i optimiranje procesnih uvjeta proizvodnje lipaze uzgojem *T. lanuginosus* na bučinoj pogači kao supstratu tijekom fermentacije u uvjetima na čvrstim nosačima. Područje eksperimentalnog ispitivanja utjecaja neovisnih varijabli  $X_{1-5}$  (masa supstrata, udio inokuluma, udio vlage, vrijeme fermentacije i temperatura) na odaziv  $Y$  (aktivnost lipaze) prikazano je u **Tablici 9** u obliku kodiranih i nekodiranih vrijednosti.

**Tablica 9.** Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za proizvodnju lipaze

Faktor (varijabla)	Kodirana varijabla		
	-1	0	1
$X_1$ - Masa supstrata [g]	30	50	70
$X_2$ - Broj micelijskih diskova [-]	3	5	7
$X_3$ - Udio vlage [%]	50	60	70
$X_4$ - Vrijeme fermentacije [dani]	2	3	4

---

X <sub>5</sub> - Temperatura [°C]	35	40	45
-----------------------------------	----	----	----

---

Na temelju definiranog eksperimentalnog ispitnog područja te s obzirom na broj promatranih faktora utjecaja definirana je eksperimentalna matrica (Box-Behnken dizajn eksperimenata **Tablica 20**). Dobiveni eksperimentalni podaci aproksimirani su polinomom drugog reda:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{j=1}^{k-1} \sum_{i=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (5)$$

gdje je:  $Y$  = modelom predviđena odzivna funkcija

$\beta_0$  = konstanta jednadžbe odzivnog polinoma

$\beta_j$  = koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

$\beta_{jj}$  = koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma

$\beta_{ij}$  = koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma

$X_{i,j}$  = ispitivane nezavisne varijable (procesni uvjeti)

$k$  = broj varijabli

RSM analiza eksperimentalnih podataka, prikladnost odabranog modela, procjena konstante jednadžbe odzivnog polinoma, procjena koeficijenata modela, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitnih faktora na proces proizvodnje lipaze, te numerička optimizacija ispitnih procesnih parametara provedena je primjenom softverskog paketa Design-Expert® (verzija 7.0.0 Stat Ease, Inc. Minneapolis, SAD). Nakon provedene aproksimacije eksperimentalnih podataka, konstruirana je odzivna površina koja omogućava 3D vizualni prikaz međusobnog utjecaja ispitnih nezavisnih varijabli na promatrani odaziv (aktivnost lipaze).

#### 3.2.4.4. Proizvodnja lipaze u laboratorijskim staklenkama

Za provedbu procesa optimizacije uvjeta proizvodnje lipaze korištene su laboratorijske staklenke ukupnog volumena 650 cm<sup>3</sup>. Eksperimentalni plan koji uključuje provedbu 46 eksperimenata sa 6 ponavljanja u centralnoj točki ispitnog područja prikazan je u **Tablici 20**. Prema navedenom eksperimentalnom planu provedena je fermentacija na čvrstim nosačima na način da su u laboratorijske staklenke odvagani usitnjeni peleti buče te je provedena korekcija početne vlažnosti

supstrata dodatkom potrebnog volumena demineralizirane vode (varijable  $X_1$  i  $X_3$ ). Uzorci su sterilizirani u autoklavu (15 min, 121 °C), ohlađeni na sobnu temperaturu te inokulirani. Inokulum je pripremljen suspendiranjem spora s micelijskih diskova ( $\emptyset = 1$  cm; varijabla  $X_2$ ) *T. lanuginosus* na PDA agaru (poglavlje 3.2.4.2.) u 5 cm<sup>3</sup> demineralizirane i sterilizirane vode. SSF je proveden inkubiranjem inokuliranog supstrata u inkubatoru s ventilacijom postavljenom na 20% i temperaturom definiranom prema eksperimentalnom planu (varijabla  $X_5$ ). Nakon fermentacije (vrijeme fermentacije definirano kao varijabla  $X_4$ ) provedena je ekstrakcija lipaze intenzivnim miješanjem 2 g fermentiranog materijala i 10 cm<sup>3</sup> TRIS-HCl pufera (50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH = 9) tijekom 15 minuta. Ekstrakti su izbistreni centrifugiranjem (5 minuta, 10 000 rpm). Dobiveni supernatant korišten je za mjerenje volumne aktivnosti lipaze ( $r_1$ ) prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.8. te za mjerenje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom (poglavlje 3.2.4.5.). Iz izračunate vrijednosti za volumnu aktivnost lipaze ( $r_1$ ) [U/cm<sup>3</sup>] i poznate masene koncentracije proteina u uzorku ( $\gamma_{\text{protein}}$ ) [mg/cm<sup>3</sup>] izračunata je specifična aktivnost lipaze ( $r_2$ ) [U/mg<sub>protein</sub>] prema formuli:

$$r_2 = \frac{r_1}{\gamma_{\text{protein}}} \quad (6)$$

Aktivnost lipaze preračunata je na masu suhe tvari biološki obrađene bučine pogače ( $r_3$ ) [U/g<sub>st</sub>] prema izrazu:

$$r_3 = \frac{r_1 \cdot V_e}{m_{\text{uz}} \cdot w_{\text{st}}} \cdot 100 \quad (7)$$

gdje je:  $r_1$  = volumna aktivnost lipaze [U/cm<sup>3</sup>]

$r_2$  = specifična aktivnost lipaze [U/mg<sub>protein</sub>]

$r_3$  = aktivnost lipaze preračunata na masu suhe tvari [U/g<sub>st</sub>]

$V_e$  = volumen enzimskog preparata [cm<sup>3</sup>]

$m_{\text{uz}}$  = masa uzorka [g]

$w_{\text{st}}$  = maseni udio suhe tvari u urozku [%]

#### 3.2.4.5. Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom

Koncentracija proteina u uzorcima dobivenih nakon provedene ekstrakcije biološki obrađene bučine pogače određena je spektrofotometrijski reakcijom bazičnih i aromatskih bočnih ogranaka

proteina s bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 uslijed čega dolazi do stvaranja kompleksa protein:boja, na sljedeći način:

U PMMA kivetu dodano je 0,1 cm<sup>3</sup> razrijeđene otopine proteina i 2 cm<sup>3</sup> Bradfordičinog reagensa. Nakon inkubacije (25 °C, 5 minuta) izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 595 nm. Mjerenje je provedeno nasuprot slijepe probe za čiju je pripremu korišteno 0,1 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode i 2 cm<sup>3</sup> Bradfordičinog reagensa. Mjerenja su provedena u najmanje tri ponavljanja. Standard proteina goveđi serumski albumin korišten je za kreiranje baždarnog pravca (formula (8)) prema kojemu je izračunata masena koncentracija proteina (formula (9)):

$$y = 0,8002 \cdot x - 0,0628 \quad (8)$$

$$\gamma_{protein} = 0,8002 \cdot A_{595} - 0,0628 \quad (9)$$

gdje je:  $\gamma_{protein}$  = masena koncentracija proteina [mg/cm<sup>3</sup>]

$A_{595}$  = apsorbancija izmjerena pri 595 nm [-]

#### 3.2.4.6. Analiza udjela suhe tvari u uzorcima bučine pogače

Uređaj za radijacijsko-infracrveno sušenje korišten je za analizu udjela suhe tvari u uzorcima bučine pogače prije, tijekom i nakon SSF procesa termogravimetrijskom metodom pri temperaturi od 105 °C (kriterij završetka sušenja: gubitak mase od 1 mg u 50 s).

#### 3.2.4.7. Mjerenje pH supstrata

U svrhu praćenja promjene pH vrijednosti bučine pogače prije, tijekom i nakon fermentacije, provedena je ekstrakcija intenzivnim miješanjem 2 g uzorka i 10 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode tijekom 15 minuta. Ekstrakti su izbistreni centrifugiranjem (5 minuta, 10 000 rpm). Dobiveni supernatant korišten je za mjerenje pH vrijednosti laboratorijskim pH-metrom.

#### 3.2.4.8. Mjerenje temperature supstrata tijekom fermentacije

U svrhu praćenja temperature tijekom SSF procesa korišten je laboratorijski termometar (LLG-termometar opće namjene) postavljen u središte inokuliranog supstrata. Promjena temperature je bilježena u pravilnim vremenskim intervalima svaka 24 sata.

### 3.2.5. Koncentriranje i pročišćavanje sirovog enzimskog pripravka kromatografskom metodom

Proizvodnja lipaze provedena je prema optimiranim uvjetima SSF procesa ( $m_s = 50$  g,  $n_{MD} = 7$ ,  $w_{H_2O} = 60\%$ ,  $t = 2$  dana,  $T = 45$  °C). S ciljem proizvodnje potrebnog volumena ekstrakta enzima provedena je kruto-tekuća ekstrakcija 40 g biološki obrađene bučine pogače u 200 cm<sup>3</sup> TRIS-HCl pufera (50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH = 9). Ekstrakt je izbistren centrifugiranjem (5 min, 10 000 rpm). Zatim je provedeno koncentracije uparivanjem 100 cm<sup>3</sup> enzimskog ekstrakta na rotacijskom vakuum uparivaču do 7,1 cm<sup>3</sup> pri temperaturi od 40 °C i vakuumu od 30 mbar tijekom 2 sata.

Nakon koncentriranja sirovog enzimskog pripravka, izuzeto je 0,5 cm<sup>3</sup> koncentriranog enzimskog ekstrakta te je provedeno pročišćavanje lipaze kromatografskom metodom temeljenom na isključivanju po veličini pojedinog analita. U tu svrhu, korištena je staklena kromatografska kolona dimenzija 34,5 cm x 1 cm ispunjena stacionarnom fazom Sephadex G-100. Eluiranje analita provedeno je primjenom TRIS-HCl pufera (50 mmol/dm<sup>3</sup>; pH = 8) kao mobilne faze uz protok od 0,67 cm<sup>3</sup>/min. Tijekom pročišćavanja provedeno je prikupljanje frakcija. Volumen jedne frakcije iznosio je 0,5 cm<sup>3</sup>. U svakoj frakciji izmjerena je aktivnost lipaze (poglavlje 3.2.3.8.). Postupak kromatografskog pročišćavanja koncentriranog enzimskog pripravka ponovljen je 5 puta. Frakcije u kojima je izmjerena najveća aktivnost lipaze su prikupljene u jednu epruvetu. Pročišćena lipaza korištena je za elektroforezu i procjenu molekulske mase lipaze.

Dobiveni rezultati volumne aktivnosti ( $r_1$  [U/cm<sup>3</sup>]), koncentracije proteina ( $\gamma_{protein}$  [mg/cm<sup>3</sup>]) i volumena enzimskog pripravka ( $V_e$  [cm<sup>3</sup>]) prije i nakon pročišćavanja korišteni su za izračun ukupne aktivnosti [U], ukupnih proteina [mg], specifične aktivnosti lipaze ( $r_2$  [U/mg<sub>protein</sub>]), stupnja pročišćavanja ( $F$  [-]) i prinosa pročišćavanja [%] prema formulama:

$$Ukupna\ aktivnost = r_1 \cdot V_e \quad (10)$$

$$Ukupni\ proteini = \gamma_{protein} \cdot V_e \quad (11)$$

$$F = \frac{r_{2\text{nakon pročišćavanja}}}{r_{2\text{prije pročišćavanja}}} \quad (12)$$

$$Prinos = \frac{Ukupna\ aktivnost\ nakon\ pročišćavanja}{Ukupna\ aktivnost\ prije\ pročišćavanja} \cdot 100 \quad (13)$$

### 3.2.6. Elektroforeza pročišćene lipaze

#### 3.2.6.1. Priprema kemikalija za elektroforezu

Pufer za elektroforezu:

Otopina pufera pripremljena je otapanjem 30,285 g TRIS baze, 144,134 g glicina i 10 g SDS-a u 1 dm<sup>3</sup> ultračiste vode uz miješanje na magnetskoj miješalici pri 400 rpm. Dobivena otopina pufera razrijeđena je 10 puta prije korištenja.

Pufer za uzorak:

Otopina pufera za uzorke pripremljena je miješanjem 1,25 cm<sup>3</sup> TRIS-HCl pufera (0,5 mol/dm<sup>3</sup>; pH = 6,8), 2,50 cm<sup>3</sup> glicerola, 2,00 cm<sup>3</sup> vodene otopine SDS-a (10%, w/v), 0,20 cm<sup>3</sup> vodene otopine bromfenolplavo (10%, w/v) i 3,55 cm<sup>3</sup> ultračiste vode.

Otopina za tretiranje proteina:

Otopina za tretiranje proteina pripremljena je miješanjem 0,950 cm<sup>3</sup> pufera za uzorke i 0,005 cm<sup>3</sup> β-merkaptetanola.

Otopina za bojenje:

Otopina je pripremljena otapanjem 0,1 g Commassie Brilliant Blue G-250 u 50 cm<sup>3</sup> metanola, 7 cm<sup>3</sup> vodene otopine octene kiseline (10%, v/v) i 43 cm<sup>3</sup> ultračiste vode.

#### 3.2.6.2. Postupak provedbe elektroforeze

Elektroforeza proteina provedena je primjenom 6% gela za sabijanje i 12% gela za razdvajanje pripremljenih u vertikalnoj jedinici za elektroforezu na sljedeći način: između stakala koji se postavljaju na držače jedinice za elektroforezu najprije je izliven gel za razdvajanje do 3 cm ispod ruba stakla čime je započela polimerizacija gela u trajanju od oko 30 minuta. U sljedećem koraku izliven je gel za sabijanje do vrha stakla. Na vrhu je uronjen češljic koji formira jažice u koje se nanose uzorci za elektroforezu. Nakon toga komora za pufer, prostor iznad gela i prostor jažica ispunjen je puferom za provedbu elektroforeze.

Uzorci za elektroforezu pripremljeni su na način da je 0,01 cm<sup>3</sup> uzorka proteina pomiješano sa 0,01 cm<sup>3</sup> otopine za tretiranje proteina. Uzorci su potom centrifugirani (1 min, 6000 rpm) te inkubirani na 95 °C 10 minuta.

Nakon pripreme uzorka, provedeno je injektiranje uzoraka u jažice gela. U prvu jažicu dodano je 0,005 cm<sup>3</sup> pripremljenog uzorka koji sadrži proteinske markere (PageRuler™). U drugu jažicu



dodano je 0,01 cm<sup>3</sup> pripremljenog uzorka koji sadrži nepročišćeni koncentrirani ekstrakt lipaze. U treću jažicu dodano je 0,01 cm<sup>3</sup> pripremljenog uzorka koji sadrži standard komercijalne lipaze (Lipolase 100L). U četvrtu jažicu dodano je 0,01 cm<sup>3</sup> pripremljenog uzorka koji sadrži pročišćeni ekstrakt lipaze (protokol pročišćavanja opisan u poglavlju 3.2.5.).

Nakon što su u jažice dodani uzorci te je jedinica za elektroforezu napunjena puferom za provedbu elektroforeze, sustav je zatvoren poklopcem i priključen na izvor istosmjerne struje. Prvih 10 minuta elektroforeza gelova provedena je pri konstantnom naponu od 100 V, a nakon toga pri naponu od 200 V. Elektroforeza je provedena u trajanju od oko 45 minuta, odnosno sve dok se crta s uzorcima nije spustila do dna stakalaca. Nakon završetka elektroforeze, gel je odvojen od stakalaca te je provedeno bojanje gela.

Bojanje je provedeno u digestoru, na orbitalnoj tresilici pri 100 rpm. Uzorak se uroni u otopinu za bojanje u kojoj se boji 1 h. Kada je bojanje uzoraka završeno, gel se odbojava. Otopina za bojanje uklonjena je iz posudice, u koju je zatim dodana 10%-tna otopina octene kiseline na način da prekrije cjelokupnu površinu gela. Pri istim uvjetima korištenim pri bojanju, uzorak je ostavljen na tresilici da se odbojava 1 h, uz jednu izmjenu 10%-tne octene kiseline.

### **3.2.7. Karakterizacija nepročišćene lipaze**

Proizvodnja lipaze provedena je prema optimalnim uvjetima fermentacije dobivenim RSM optimizacijom ( $m_s = 50$  g,  $n_{MD} = 7$ ,  $w_{H_2O} = 60\%$ ,  $t = 2$  dana,  $T = 45$  °C). Sirovi enzimski pripravak dobiven je ekstrakcijom lipaze prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4.4. Tijekom provedbe biokemijske karakterizacije lipaze, aktivnost enzima mjerena je prema prethodno opisanom protokolu u poglavlju 3.2.3.8.

#### **3.2.7.1. Ovisnost aktivnosti lipaze o temperaturi**

U svrhu procjene utjecaja temperature na hidrolitičku aktivnost nepročišćene lipaze pripremljena je reakcijska smjesa miješanjem 0,120 cm<sup>3</sup> otopine pNP-palmitata (prethodno pripremljenog u acetonitrilu u koncentraciji od 10 mmol/dm<sup>3</sup>) i 2,880 cm<sup>3</sup> TRIS-HCl pufera (50 mmol/dm<sup>3</sup>; pH = 9) sa 0,3% (w/v) gume arabike (reakcijska smjesa korištena u standardnom testu za određivanje aktivnosti lipaze). Pripremljena reakcijska smjesa inkubirana je u temperaturnom intervalu od 25 °C do 60 °C. Nakon inkubacije, aktivnost lipaze određena je prema standardnom protokolu (poglavlje 3.2.3.8.). Budući da inkubiranjem reakcijske smjese pri temperaturi većoj od 40 °C dolazi do spontane hidrolize supstrata pNP-palmitata, paralelno je provedeno mjerenje promjene

apsorbancije u vremenu slijepe probe na način da je u kivetu dodano 0,9 cm<sup>3</sup> reakcijske smjese i 0,1 cm<sup>3</sup> TRIS-HCl pufera (50 mmol/dm<sup>3</sup>; pH = 9). Glavna proba provedena je na isti način ali je umjesto pufera dodano 0,1 cm<sup>3</sup> razrijeđene otopine nepročišćene lipaze. Konačna volumna aktivnost izračunata je kao razlika mjerenja aktivnosti glavne probe i aktivnosti slijepe probe.

### 3.2.7.2. Stabilnost lipaze tijekom inkubacije pri povišenoj temperaturi

Termostabilnost nepročišćene lipaze ispitana je inkubacijom enzima u temperaturnom rasponu od 25 °C do 80 °C, te je aktivnost mjerena periodično tijekom 24 sata. Aktivnost lipaze izražena je kao relativna aktivnost, u odnosu na početnu aktivnost nepročišćene lipaze ( $r_1 = 5,44 \text{ U/cm}^3$ ). Eksperimentalni podaci korišteni su za procjenu numeričke vrijednosti konstante brzine deaktivacije lipaze ( $k_d$ ) pomoću kinetike prvog reda:

$$\frac{d_{\text{relativna aktivnost}}}{dt} = -k_d \cdot \text{relativna aktivnost} \quad (14)$$

Za procjenu  $k_d$  primijenjena je nelinearna regresijska analiza eksperimentalnih podataka metodom najmanjih kvadrata implementirana u programskom paketu SCIENTIST (MicroMath Scientist®). Izračunati podaci uspoređeni su s eksperimentalnim podacima, a varijanca je definirana zbrojem kvadrata razlika između eksperimentalnih i izračunatih podataka.

### 3.2.7.3. Ovisnost aktivnosti lipaze o pH

Ovisnost aktivnosti nepročišćene lipaze o pH provedena je pripremom reakcijske smjese u TRIS-HCl puferu (50 mmol/dm<sup>3</sup>) u pH rasponu od 7 do 10. Budući da je ekstrakcija lipaze provedena pomoću TRIS-HCl pufera (50 mmol/dm<sup>3</sup>; pH = 9), korekcija pH nepročišćenog ekstrakta provedena je pomoću 0,1 mol/dm<sup>3</sup> ili 0,1 mol/dm<sup>3</sup> HCl ili NaOH. Volumna aktivnost lipaze mjerena je spektrofotometrijski i izračunata prema formuli (1).

### 3.2.7.4. Stabilnost lipaze tijekom skladištenja

Da bi se ispitala stabilnost enzimskog preparata tijekom skladištenja, nepročišćena lipaza skladištena je na 25 °C, 4 °C i -20 °C te je mjerena aktivnost TLL periodično tijekom 100 dana. Enzimski ekstrakti skladišteni pri temperaturi od -20 °C pripremljeni su u zasebnim Eppendorf epruvetama da bi se isključio utjecaj zamrzavanja i odmrzavanja na aktivnost lipaze. Dobiveni

rezultati korišteni su za procjenu konstante deaktivacije lipaze ( $k_d$ ) prema formuli (14) i protokolu opisanom u poglavlju 3.2.7.2. Procjena vremena skladištenja za koje se aktivnost lipaze smanji za 50% ( $t_{1/2}$ ) ispitana je za svaku temperaturu skladištenja prema sljedećem izrazu (Yang i sur., 2010):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (15)$$

### 3.2.7.5. Utjecaj organskog otapala na aktivnost lipaze

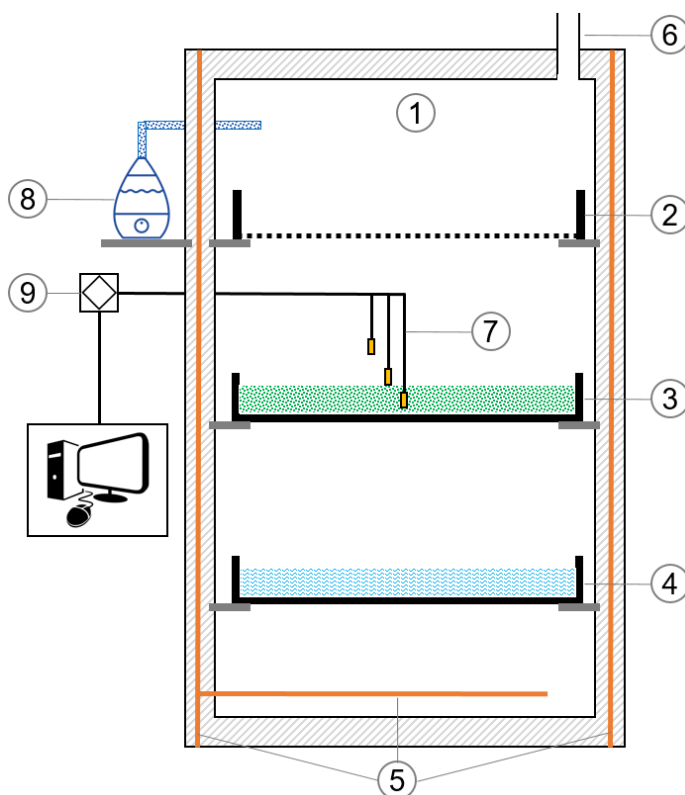
Procjena utjecaja organskog otapala na aktivnost nepročišćene lipaze ispitana je mjerenjem aktivnosti lipaze nakon inkubacije enzimskog preparata uz dodatak 1% (v/v) organskog otapala pri 25 °C i 60 min. Aktivnost lipaze izražena je kao relativna aktivnost, u odnosu na aktivnost lipaze izmjerena testom u kojem je umjesto organskog otapala korišten TRIS-HCl pufer (50 mmol/dm<sup>3</sup>; pH = 9). Organska otapala korištena u istraživanju su: aceton, acetonitril, etanol, heksan, heptan, kloroform, metanol, toluen.

### 3.2.7.6. Utjecaj iona metala na aktivnost lipaze

Ispitivanje utjecaja iona metala na aktivnost nepročišćene lipaze provedeno je prema sljedećem protokolu: u epruvetu je dodano 0,5 cm<sup>3</sup> TRIS-HCl pufera (50 mmol/dm<sup>3</sup>; pH = 9), 0,2 cm<sup>3</sup> otopine soli i 0,2 cm<sup>3</sup> nepročišćenog ekstrakta lipaze. Nakon inkubacije (30 minuta, 25 °C) provedeno je mjerenje aktivnosti lipaze. Aktivnost lipaze izražena je kao relativna aktivnost, u odnosu na aktivnost lipaze izmjerena testom u kojem je umjesto otopine soli korišten TRIS-HCl pufer (50 mmol/dm<sup>3</sup>; pH = 9). Otopine su pripremljene otapanjem soli u vodi u koncentraciji od 10 mmol/dm<sup>3</sup>. Koncentracija soli u smjesi tijekom inkubacije iznosila je 2,22 mmol/dm<sup>3</sup>. Soli korištene u istraživanju su: kalijev klorid (KCl), natrijev klorid (NaCl), magnezijev sulfat (MgSO<sub>4</sub>), bakrov (II) klorid dihidrat (CuCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O), barijev klorid dihidrat (BaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O), manganov sulfat (MnSO<sub>4</sub>), cinkov klorid (ZnCl<sub>2</sub>), cinkov sulfat (ZnSO<sub>4</sub>), željezo (III) klorid (FeCl<sub>3</sub>).

### 3.2.8. Bioreaktor s pliticama

Uvećanje mjerila proizvodnje lipaze SSF procesom provedeno je u bioreaktoru s pliticama (dimenzija 75 × 154 × 70 cm) izgrađenom od nehrđajućeg čelika (**Slika 13**). Bioreaktor se sastoji od termostatske komore s mogućnošću kontrole temperature u rasponu od 25 °C do 65 °C. Pomoću temperaturnih sondi povezanih PLC sustavom provedeno je *on-line* mjerenje temperature na različitim mjestima u bioreaktoru. S vanjske strane bioreaktora nalazi se spremnik s demineraliziranom i steriliziranom vodom koji je integriran s gornjim dijelom bioreaktora, a služi za ovlaživanje zraka unutar termostatske komore. U termostatskoj komori bioreaktora postavljene su tri plitice dimenzija 50 × 5 × 40 cm. Gornja plitica s perforacijama osigurava ravnomjernu raspodjelu vlažnog zraka po supstratu. U srednju pliticu bez perforacija postavlja se supstrat pripremljen za SSF proces. U pliticu bez perforacija na dnu termostatske komore postavlja se demineralizirana i sterilizirana voda u svrhu dodatnog ovlaživanja zraka postupnim isparavanjem vode. Prije provedbe SSF procesa, provedena je sterilizacija termostatske komore bioreaktora i plitica 70%-tnim etanolom te vrućim zrakom (121 °C, 20 min).



**Slika 13.** Shematski prikaz bioreaktora s pliticama: 1) termostatska komora, 2) plitica s perforacijama, 3) plitica za uzorak, 4) plitica za vodu, 5) grijači, 6) ventil za zrak, 7) temperaturne sonde, 8) sustav za ovlaživanje zraka, 9) PLC sustav povezan na PC

### 3.2.8.1. Priprema inokuluma za proces proizvodnje lipaze u bioreaktoru s pliticama

Inokulum korišten za proces biološke obrade bučine pogače pripremljen je na sljedeće načine:

- a) Inokulum pripremljen suspendiranjem spora s 28 micelijskih diskova ( $\varnothing = 1$  cm) *T. lanuginosus* na PDA agaru u 20 cm<sup>3</sup> demineralizirane i sterilizirane vode.
- b) Inokulum pripremljen uzgojem *T. lanuginosus* na različitim lignoceluloznim supstratima (bučina pogača, pljevica pira, pljevica ječma, repini rezanci) u laboratorijskim staklenkama.

Postupak pripreme suspenzije spora *T. lanuginosus* na PDA agaru opisan je u poglavlju 3.2.4.4. Postupak pripreme inokuluma za svaki od odabranih lignoceluloznih supstrata proveden je na način da je u 4 laboratorijske staklenke odvagano 30 g supstrata te je provedena korekcija početne vlažnosti supstrata dodatkom potrebnog volumena demineralizirane vode. U eksperimentima u kojima je korištena bučina pogača dodano je 37 cm<sup>3</sup> ( $w_{H_2O} = 60\%$ ) demineralizirane vode. U eksperimentima u kojima su korišteni pljevica pira i pljevica ječma dodano je 60 cm<sup>3</sup> ( $w_{H_2O} = 70\%$ ), a u eksperimentima u kojima su korišteni repini rezanci 80 cm<sup>3</sup> ( $w_{H_2O} = 75\%$ ) demineralizirane vode. Uzorci su sterilizirani u autoklavu (15 min, 121 °C), ohlađeni na sobnu temperaturu te inokulirani. Inokulum je pripremljen suspendiranjem spora sa 7 micelijskih diskova ( $\varnothing = 1$  cm) *T. lanuginosus* uzgojene na PDA agaru u 5 cm<sup>3</sup> demineralizirane i sterilizirane vode. Uzgoj *T. lanuginosus* na PDA agaru proveden je u inkubatoru s ventilacijom (brzina ventilatora postavljena na 20%) pri 45 °C u trajanju od 7 dana.

Nakon pripreme inokuluma provedena je biološka obrada bučine pogače. U 4 laboratorijske staklenke odvagano je 62,5 g usitnjenih bučinih peleta te je dodano 87,5 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode (ukupna masa vlažnog supstrata 600 g,  $w_{H_2O} = 60\%$ ). Uzorci su sterilizirani u autoklavu (15 min, 121 °C) te ohlađeni na sobnu temperaturu. Sterilizirani supstrat prebačen je u sterilnim uvjetima u prethodno sterilizirane plitice (27,5 × 1,5 × 18,5 cm) u steriliziranoj termostatskoj komori bioreaktora na 45 °C. Potom je supstrat inokuliran s 20 cm<sup>3</sup> suspenzije spora ili inokuluma pripremljenog uzgojem *T. lanuginosus* na lignoceluloznim supstratima. Tijekom 7 dana SSF procesa provedeno je ovlaživanje zraka unutar komore bioreaktora raspršivanjem demineralizirane i sterilizirane vode iznad gornje plitice s perforacijama (2 dm<sup>3</sup> vode po danu) te postupnim isparavanjem demineralizirane i sterilizirane vode s plitice postavljene na dno bioreaktora. Tijekom fermentacije, svakodnevno je provedeno uzorkovanje na način da je izuzeto oko 10 g fermentiranog materijala s 3 mjesta plitice (ukupna masa uzorka ≈ 30 g). Uzorak je homogeniziran te korišten za ekstrakciju enzima i mjerenje volumne aktivnosti lipaze prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.4.4.).

### 3.2.8.2. Uvećanje mjerila procesa biološke obrade bučine pogače u bioreaktoru s pliticama

Priprema inokuluma:

Inokulum je pripremljen na način da je u 17 laboratorijskih staklenki odvagano po 30 g repinih rezanaca te je dodano 80 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode kako bi se postigao udio vlage od 75%. Uzorci su sterilizirani u autoklavu (15 min, 121 °C), ohlađeni na sobnu temperaturu te inokulirani. Inokulum je pripremljen suspendiranjem spora sa 7 micelijskih diskova ( $\varnothing = 1$  cm) *T. lanuginosus* na PDA agaru u 5 cm<sup>3</sup> demineralizirane i sterilizirane vode. Uzgoj inokuluma radnog mikroorganizma je proveden inkubiranjem inokuliranog supstrata u inkubatoru s ventilacijom postavljenom na 20% i 45 °C u trajanju od 7 dana. U svrhu izračuna proizvedene mase inokuluma provedeno je vaganje praznih laboratorijskih staklenki i laboratorijskih staklenki nakon postupka proizvodnje inokuluma *T. lanuginosus* na repinim rezancima.

Inokulacija bučine pogače i provedba procesa biološke obrade u bioreaktoru s pliticama:

U svrhu uvećanja mjerila proizvodnje lipaze korišten je bioreaktor s pliticama (dimenzije plitice 50 × 5 × 40 cm). U 17 laboratorijskih staklenki odvagano je 62,5 g usitnjene bučine pogače te je dodano 87,5 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode (ukupna masa vlažnog supstrata 2550 g,  $w_{H_2O} = 60\%$ ). Uzorci su sterilizirani u autoklavu (15 min, 121 °C) te ohlađeni na sobnu temperaturu. Sterilizirani supstrat prebačen je u prethodno sterilizirane plitice postavljene u steriliziranu termostatsku komoru bioreaktora na 45 °C. Potom je supstrat inokuliran s 1350 g inokuluma pripremljenog uzgojem *T. lanuginosus* na repinim rezancima. Tijekom 7 dana SSF procesa provedeno je ovlaživanje zraka unutar komore bioreaktora raspršivanjem demineralizirane i sterilizirane vode iznad gornje plitice s perforacijama (2 dm<sup>3</sup> vode po danu) te postupnim isparavanjem demineralizirane i sterilizirane vode s plitice postavljene na dno bioreaktora. Tijekom fermentacije, svakodnevno je provedeno uzorkovanje tako da je izuzeto oko 50 g fermentiranog materijala s 3 mjesta plitice (ukupna masa uzorka ≈ 150 g). Uzorak je homogeniziran te korišten za mjerenje suhe tvari supstrata (protokol opisan u poglavlju 3.2.4.6.) ekstrakciju lipaze (protokol opisan u poglavlju 3.2.4.4.) i mjerenje volumne aktivnosti lipaze (protokol opisan u poglavlju 3.2.3.8.), za mjerenje koncentracije proteina (protokol opisan u poglavlju 3.2.4.5.), i mjerenje pH supstrata (protokol opisan u poglavlju 3.2.4.7.). Tijekom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama, provedeno je *on-line* mjerenje temperature pomoću temperaturnih sondi. Promjena temperature bilježena je u pravilnim vremenskim intervalima od 60 min tijekom 7 dana SSF procesa na tri mjesta: unutar sloja supstrata, na površini supstrata i iznad površine supstrata.

### **3.2.9. Optimiranje biokatalitičke hidrolize jestivog ulja**

Nakon proizvodnje TLL u bioreaktoru s pliticama ispitana je mogućnost primjene lipaze kao biokatalizatora u reakciji hidrolize jestivih ulja. Proizvedeni enzimski ekstrakt prvotno je koncentriran liofilizacijom. Enzimska hidroliza različitih vrsta jestivih ulja (navedenih u poglavlju 3.2.9.4.) provedena je pri prethodno optimiranim reakcijskim uvjetima enzimske hidrolize hladno prešanog suncokretovog ulja.

#### 3.2.9.1. Ekstrakcija i koncentriranje enzimskog ekstrakta liofilizacijom

Postupak liofilizacije korišten je u svrhu koncentriranja lipaze u sirovom enzimskom pripravku. U tu svrhu, provedena je biološka obrada bučine pogače u bioreaktoru s pliticama prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.8.2. Nakon tri dana SSF procesa, provedena je kruto-tekuća ekstrakcija na način da je u 200 g biološki obrađenog materijala dodano 1400 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode. Ekstrakcija je provedena miješanjem pomoću miješala s lopaticama pri 250 rpm i sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta. Tekući ekstrakt odvojen je od krutog materijala filtracijom kroz pamučnu gazu (Tosama d.o.o., Domžale, Slovenija) te je izbistren centrifugiranjem (5 minuta, 10 000 rpm).

Dobiveni supernatant profiltriran je pomoću nabranog filter papira (Munktell 21/N) te korišten u procesu liofilizacije. Prije liofilizacije, 150 cm<sup>3</sup> tekućeg enzimskog pripravka zamrznuto je u Petrijevoj zdjelici na temperaturi od -80 °C (Freezer SWUF-80) kroz 3 sata. Nakon toga, proveden je postupak primarnog sušenja liofilizacijom u trajanju od 19 sati pri tlaku od 0,250 mbar. Nakon primarnog sušenja provedeno je sekundarno sušenje pri tlaku od 0,001 mbar u trajanju od 2 sata. Dobiveni sirovi liofilizirani pripravak lipaze skladišten je u tamnim bočicama na temperaturi od 4 °C.

Aktivnost TLL mjerena je tijekom 80 dana kako bi se procijenila stabilnost sirovog ekstrakta liofilizirane lipaze tijekom skladištenja pri temperaturi od 4 °C. Termostabilnost proizvedene TLL ispitana je nakon otapanja nepročišćenog liofiliziranog ekstrakta lipaze u TRIS-HCl puferu (50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH = 7,31) u koncentraciji od 112,66 mg/cm<sup>3</sup> tijekom inkubacije na 40 °C u trajanju od 96 sati. Određivanje volumene aktivnosti TLL provedeno je prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.3.8. u tri paralelna ponavljanja. Rezultati su prikazani kao srednja relativna vrijednost aktivnosti izračunata u odnosu na početnu aktivnost TLL prije skladištenja ili inkubacije na povišenoj temperaturi.

### 3.2.9.2. Eksperimentalna matrica i optimiranje procesa biotransformacije suncokretovog ulja

Metoda odzivnih površina (RSM) korištena je za procjenu utjecaja i optimiranje procesnih uvjeta hidrolize hladno prešanog suncokretovog ulja (Tvornica ulja Vinkovci d.o.o., Vinkovci, Hrvatska) pomoću sirovog liofiliziranog pripravka lipaze. Područje eksperimentalnog ispitivanja utjecaja neovisnih varijabli  $X_{6-8}$  (maseni udio ulja, maseni udio enzima i pH) na odaziv  $Y$  (konverzija triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina,  $X_{hidroliza}$  [%]) prikazano je u **Tablici 10** u obliku kodiranih i nekodiranih vrijednosti.

**Tablica 10.** Faktori utjecaja i područje eksperimentalnog ispitivanja u tri razine za hidrolizu suncokretovog ulja pomoću sirovog liofiliziranog pripravka lipaze

Faktor (varijabla)	Kodirana varijabla		
	-1	0	1
$X_6$ - Maseni udio ulja [%]	25	50	75
$X_7$ - Maseni udio enzima [%]	5,0	7,5	10,0
$X_8$ - pH [-]	6,0	7,5	9,0

Na temelju definiranog eksperimentalnog ispitnog područja te s obzirom na broj promatranih faktora utjecaja definirana je eksperimentalna matrica (Box-Behnken dizajn eksperimenata **Tablica 23**).

Hidroliza ulja provedena je u tamnim staklenim vijalicama ukupnog volumena od 20 cm<sup>3</sup>. Tijekom optimiranja procesa hidrolize ulja, masa dodane vode (pufera) bila je konstantna dok su se mijenjali maseni udio ulja i maseni udio enzima. U staklene vijalice dodano je 1,5 g pufera. Natrij-fosfatni pufer (50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH 6) i TRIS-HCl pufer (50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH 7,5 i 9) korišteni su za procjenu utjecaja različitih pH vrijednosti reakcijskog medija (varijabla  $X_8$ ) na hidrolizu ulja. Prema Box-Behnken dizajnu, izračunata je potrebna masa ulja (varijabla  $X_6$ ) za pojedini eksperiment prema formuli (16) (maseni udio ulja izražen na ukupnu masu reakcijske smjese) i dodana u vijalicu:

$$m_{ulje} = \frac{w_{ulje} \cdot m_{pufer}}{100 - w_{ulje}} \quad (16)$$

gdje je:  $m_{ulje}$  = masa ulja u reakcijskoj smjesi [g]

$w_{ulje}$  = maseni udio ulja u reakcijskoj smjesi [%]



$m_{\text{pufer}}$  = masa pufera u reakcijskoj smjesi [g]

Masa potrebnog sirovog liofiliziranog pripravka lipaze dodana u vijalicu izračunata je prema formuli (17) kao maseni udio enzima izražen na ukupnu masu reakcijske smjese definiran prema Box-Behnken dizajnu (varijabla  $X_7$ ).

$$m_{\text{enzim}} = \frac{(m_{\text{pufer}} + m_{\text{ulje}}) \cdot w_{\text{enzim}}}{100} \quad (17)$$

gdje je:  $m_{\text{enzim}}$  = masa sirovog liofiliziranog pripravka lipaze [g]

$w_{\text{enzim}}$  = maseni udio enzima u reakcijskoj smjesi [%]

Nakon dodavanja pufera, ulja i enzima u vijalicu, reakcijska smjesa je homogenizirana na magnetskoj miješalici (350 rpm, 5 min). Nakon homogenizacije, 0,2 cm<sup>3</sup> reakcijske smjese izdvojeno je u Erlenmeyerovu tikvicu postavljenu na analitičku vagu te je očitana masa uzorka (slijepa proba korištena za izračun konverzije triacilglicerola).

Potom je u Erlenmeyer tikvicu dodano 20 cm<sup>3</sup> smjese etanol:aceton (1:1) u svrhu denaturacije enzima i otapanja ulja. U pripremljenu smjesu dodano je 0,2 cm<sup>3</sup> indikatora (0,5%-tna otopina fenolftaleina u 50%-tnom etanolu) te je provedena titracija natrijevim hidroksidom (20 mmol/dm<sup>3</sup>) do pojave svjetlo ružičaste boje koja je postojana minimalno 10 sekundi te je očitani volumen utrošenog natrijeva hidroksida.

Nakon uzorkovanja i mjerenja slijepa probe, provedena je hidroliza ulja pri 40 °C na magnetnoj miješalici (350 rpm) u trajanju od 24 h. Nakon hidrolize, provedeno je uzorkovanje i titracija na isti način kao što je provedeno uzorkovanje slijepa probe. Svi eksperimenti provedeni su u tri ponavljanja. Konverzija triacilglicerola izračunata je prema formuli (18) za slijepu i glavnu probu. Konačni rezultat dobiven je iz razlike postotka hidrolize glavne probe i slijepa probe.

$$X_{\text{hidroliza}} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot M_{\text{NaOH}} \cdot 10^{-3} \cdot MW_{\text{MK,SR}}}{m_{\text{hidrolizat}} \cdot w_{\text{ulje}}} \cdot 100 \quad (18)$$

gdje je:  $X_{\text{hidroliza}}$  = konverzija triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina [%]

$V_{\text{NaOH}}$  = volumen utrošenog natrijevog hidroksida za titraciju [dm<sup>3</sup>]

$M_{\text{NaOH}}$  = molarnost korištenog natrijevog hidroksida za titraciju [mmol/dm<sup>3</sup>]

$MW_{\text{MK,SR}}$  = prosječna molekulska masa masnih kiselina ulja [g/mol]

$m_{\text{hidrolizat}}$  = masa hidrolizata korištenog za titraciju [g]

$w_{\text{ulje}}$  = maseni udio ulja u reakcijskoj smjesi [%]

Nakon provedene hidrolize suncokretovog ulja, dobiveni eksperimentalni podaci aproksimirani su polinomom drugog reda (formula (5)), provedena je RSM analiza, statistička analiza (ANOVA), numerička optimizacija ispitnih procesnih parametara te je konstruirana odzivna površina koja omogućava 3D vizualni prikaz međusobnog utjecaja ispitnih nezavisnih varijabli na promatrani odaziv (konverzija triacilglicerola) primjenom softverskog paketa Design-Expert® (verzija 7.0.0 Stat Ease, Inc. Minneapolis, SAD).

### 3.2.9.3. Utjecaj temperature na hidrolizu ulja pomoću lipaze

Da bi se ispitaio utjecaj temperature na konverziju triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina pomoću sirovog liofiliziranog preparata lipaze, provedena je hidroliza hladno prešanog suncokretovog ulja u temperaturnom rasponu od 30 °C do 70 °C pri optimiziranim reakcijskim uvjetima:  $w_{\text{ulje}} = 37,69\%$ ,  $w_{\text{enzim}} = 7\%$ , pH = 7,31. U vijalicu je dodano 1,5 g pufera (natrij-fosfatni pufer, 50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH = 7,31), 0,9073 g ulja i 0,1685 g liofilizata. Proces hidrolize proveden je prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.9.2., te je izračunata konverzija triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina prema formuli (18).

### 3.2.9.4. Hidroliza različitih vrsta ulja pomoću sirovog enzimskog liofilizata

Proces hidrolize različitih vrsta ulja proveden je pri optimiziranim reakcijskim uvjetima:  $w_{\text{ulje}} = 37,69\%$ ,  $w_{\text{enzim}} = 7\%$ , pH = 7,31. Svaki eksperiment proveden je u dva ponavljanja. U pravilnim vremenskim intervalima provedeno je uzorkovanje u dvije paralelne probe prema prethodno opisanom protokolu opisanom u poglavlju 3.2.9.2., te je izračunata konverzija triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina prema formuli (18). U istraživanju su korištena sljedeća ulja:

- 1) Hladno prešano suncokretovo ulje (Tvornica ulja Vinkovci d.o.o., Vinkovci, Hrvatska)
- 2) Omegol ulje (ZVIJEZDA plus d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- 3) Hladno prešano ulje konoplje (Biovega d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- 4) Ekstra djevičansko maslinovo ulje (ZVIJEZDA plus d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- 5) Djevičansko bučino ulje (SKZ Ljutomer Križevci d.o.o., Ljutomer, Slovenija)
- 6) Hladno prešano laneno ulje (SPACK B.V. Oudelandsedijk, Nieuwe-Tonge, Nizozemska)
- 7) Rafinirano kokosovo ulje (SPACK B.V. Oudelandsedijk, Nieuwe-Tonge, Nizozemska)

Za izračun konverzije triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina prema formuli (18) potrebno je u izraz uvrstiti srednju vrijednosti molekulske mase masnih kiselina prisutnih u ulju ( $MW_{MK,SR}$ , [g/mol]). Srednja vrijednost molekulske mase masnih kiselina za pojedinu vrstu ulja izračunata je prema formuli (19) na osnovi molekulske mase ( $MW_{MK}$ , [g/mol]) i masenog udjela pojedine masne kiseline u ulju ( $w_{MK}$ , [%]) prema podacima dostupnim u literaturi (Rezig i sur., 2012; Khattab i Zeitoun, 2013; Mikulcová i sur., 2017; Giakoumis, 2018), te je prikazana u **Tablici 11**. Budući da omegol ulje predstavlja mješavinu suncokretovog ulja, ulja kukuruzne klice i repičina ulja, korištena je  $MW_{MK,SR}$  izračunata za hladno prešano suncokretovo ulje.

$$MW_{MK,SR} = \sum \frac{MW_{MK} \cdot w_{MK}}{100} \quad (19)$$

**Tablica 11.** Molekulska masa ( $MW_{MK}$ , [g/mol]) i maseni udio ( $w_{MK}$ , [%]) pojedinih masnih kiselina u kemijskom sastavu različitih ulja korištenih za izračun srednje vrijednosti molekulske mase masnih kiselina ulja ( $MW_{MK,SR}$ , [g/mol])

Masna kiselina	$MW_{MK}$ [g/mol]	Hladno prešano suncokretovo ulje	Hladno prešano ulje konoplje	Ekstra djevičansko maslinovo ulje	Djevičansko bučino ulje	Hladno prešano laneno ulje	Rafinirano kokosovo ulje
		$w_{MK}$ [%]	$w_{MK}$ [%]	$w_{MK}$ [%]	$w_{MK}$ [%]	$w_{MK}$ [%]	$w_{MK}$ [%]
Kaprilna	144,210	-	-	-	-	-	6,44
Dekanska	172,260	-	-	-	-	-	5,62
Laurinska	200,320	-	-	-	-	-	46,70
Miristinska	228,370	0,04	0,04	0,08	-	-	18,75
Palmitinska	256,400	6,35	5,90	11,26	15,97	5,22	9,73
Palmitoleinska	254,414	0,07	0,10	0,88	-	-	0,11
Stearinska	284,480	3,92	2,20	2,79	4,68	4,12	2,78
Oleinska	282,470	20,90	9,00	74,52	44,11	18,30	6,86
Linolna	280,447	67,58	55,30	9,82	34,77	15,60	2,25
Alfa-linolenska	278,430	0,17	20,30	0,51	-	56,28	0,04
Arahidinska	312,530	0,22	1,70	0,49	0,41	-	0,10
<b><math>MW_{MK,SR}</math> [g/mol]</b>		<b>277,426</b>	<b>264,076</b>	<b>280,406</b>	<b>277,651</b>	<b>277,247</b>	<b>214,584</b>

### 3.2.10. Djelomično pročišćavanje sirovog liofiliziranog enzimskog preparata

U idućim poglavljima objašnjen je protokol pročišćavanja TLL iz sirovog liofiliziranog enzimskog pripravka precipitacijom proteina primjenom soli i organskog otapala s ciljem uklanjanja kontaminirajućih proteina i koncentriranja TLL.

#### 3.2.10.1. Pročišćavanje lipaze pomoću amonijeva sulfata

U Eppendorf epruvetu (ukupnog volumena od 5 cm<sup>3</sup>) odvagano je od 0,1 ± 0,001 do 0,4 ± 0,001 g sirovog liofiliziranog enzimskog pripravka (postupak liofilizacije objašnjen u poglavlju 3.2.9.1.). Potom je dodano 2 cm<sup>3</sup> vodene otopine amonijeva sulfata (70%, w/w). Istovremeno je pripremljena otopina liofilizata u istom volumenu demineralizirane vode. Nakon otapanja liofilizata, provedena je precipitacija proteina tijekom 24 h na 4 °C. Nakon precipitacije, uzorci su centrifugirani (5 min, 5000 rpm) te je odvojen supernatant od precipitata. Precipitat je rekonstituiran u 2 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode. U liofiliziranim uzorcima otopljenim u demineraliziranoj vodi, dobivenom supernatantu i rekonstituiranom precipitatu izmjerena je volumna aktivnost lipaze ( $r_1$ , [U/cm<sup>3</sup>]) (poglavlje 3.2.3.8.), masena koncentracija proteina ( $\gamma_{\text{protein}}$ , [mg/cm<sup>3</sup>]) (poglavlje 3.2.4.5.) i specifična aktivnost lipaze ( $r_2$ , [U/mg<sub>protein</sub>]) (formula (6)) prema standardnom protokolu.

Molarnost zasićene otopine amonijeva sulfata u vodi pri temperaturi od 25 °C iznosi 4,1 mol/dm<sup>3</sup> (Wingfield, 2016). Molarnost 70%-tne otopine amonijeva sulfata u vodi pri temperaturi od 25 °C iznosi 2,87 mol/dm<sup>3</sup>. Sukladno navedenom, otopina amonijeva sulfata (70%, w/w) korištena za precipitaciju proteina pripremljena je otapanjem 5,6886 g amonijeva sulfata u 15 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode.

#### 3.2.10.2. Pročišćavanje lipaze pomoću acetona

Pročišćavanje lipaze precipitacijom pomoću acetona provedeno je na način da je u Eppendorf epruvetu (ukupnog volumena od 5 cm<sup>3</sup>) odvagano 0,2 ± 0,001 g sirovog liofiliziranog enzimskog pripravka (postupak liofilizacije objašnjen u poglavlju 3.2.9.1.). Potom je dodano 2 cm<sup>3</sup> vodene otopine acetona (40 – 65%, v/v). Nakon otapanja liofilizata, provedena je precipitacija proteina tijekom 24 h na 4 °C. Nakon precipitacije, uzorci su centrifugirani (5 min, 5000 rpm) te je odvojen supernatant od precipitata. Zaostali aceton u precipitatu uklonjen je hlapljenjem u vakuum sušioniku u trajanju od 60 min pri temperaturi od 25 °C i vakuumu. Precipitat je rekonstituiran u

2 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode. U dobivenom supernatantu i rekonstituiranom precipitatu izmjerena je volumna aktivnost lipaze ( $r_1$ , [U/cm<sup>3</sup>]) (poglavlje 3.2.3.8.), masena koncentracija proteina ( $\gamma_{\text{protein}}$ , [mg/cm<sup>3</sup>]) (poglavlje 3.2.4.5.) i specifična aktivnost lipaze ( $r_2$ , [U/mg<sub>protein</sub>]) (formula (6)) prema standardnom protokolu.

### 3.2.10.3. Pročišćavanje lipaze postupnom precipitacijom pomoću acetona

Pročišćavanje TLL iz sirovog liofiliziranog enzimskog pripravka (postupak liofilizacije objašnjen u poglavlju 3.2.9.1.) postupnom precipitacijom proteina provedeno je pomoću acetona kako slijedi. U plastičnu falkon epruvetu (ukupnog volumena od 50 cm<sup>3</sup>) odvagano je 2 g liofilizata i dodano je 11 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode. Nakon otapanja liofilizata postupno je dodano 9 cm<sup>3</sup> acetona uz miješanje na vrtložnoj miješalici. Početna masena koncentracija liofilizata iznosila je 100 mg/cm<sup>3</sup>, a volumni udio acetona u smjesi iznosio je 45% (v/v). Potom je provedena precipitacija proteina tijekom 24 h na 4 °C. Nakon precipitacije, uzorci su centrifugirani (5 min, 5000 rpm) te je odvojen supernatant od precipitata. Potom je u supernatant dodana nova količina acetona u omjeru 1:1 (20 cm<sup>3</sup> supernatant + 20 cm<sup>3</sup> aceton) čime je udio acetona u smjesi povećan na 72,5% (v/v). Precipitacija proteina u drugom koraku provedena je tijekom 24 h na 4 °C. Nakon precipitacije, uzorci su centrifugirani (5 min, 5000 rpm) te je odvojen supernatant od precipitata. Zaostali aceton u precipitatu uklonjen je u vakuum sušioniku u trajanju od 60 min pri temperaturi od 25 °C i vakuumu. Precipitat je rekonstituiran u 0,5 cm<sup>3</sup> TRIS-HCl pufera (50 mmol/dm<sup>3</sup>, za mjerenje volumne aktivnosti TLL pH = 9, te za provedbu hidrolize ulja pH = 7,31). Konačni volumen pročišćenog enzima dobivenog iz 2 g liofilizata iznosio je 1,5 cm<sup>3</sup>. Analiza volumne aktivnosti lipaze ( $r_1$ , [U/cm<sup>3</sup>]) (poglavlje 3.2.3.8.), masene koncentracije proteina ( $\gamma_{\text{protein}}$ , [mg/cm<sup>3</sup>]) (poglavlje 3.2.4.5.) i specifične aktivnosti lipaze ( $r_2$ , [U/mg<sub>protein</sub>]) (formula (6)) provedena je u uzorku dobivenog nakon otapanja liofilizata u demineraliziranoj vodi, u supernatantu s 45% acetona, te u rekonstituiranom precipitatu nakon drugog koraka precipitacije acetonom (72,5%). Dobiveni rezultati korišteni su za izračun stupnja pročišćavanja ( $F$  [-]) (formula (12)) i prinosa pročišćavanja [%] (formula (13)) usporedno s izmjerenom volumnom aktivnosti TLL i masenom koncentracijom proteina u uzorku dobivenom nakon provedene kruto-tekuće ekstrakcije biološki obrađene bučine pogače (poglavlje 3.2.8.2.).

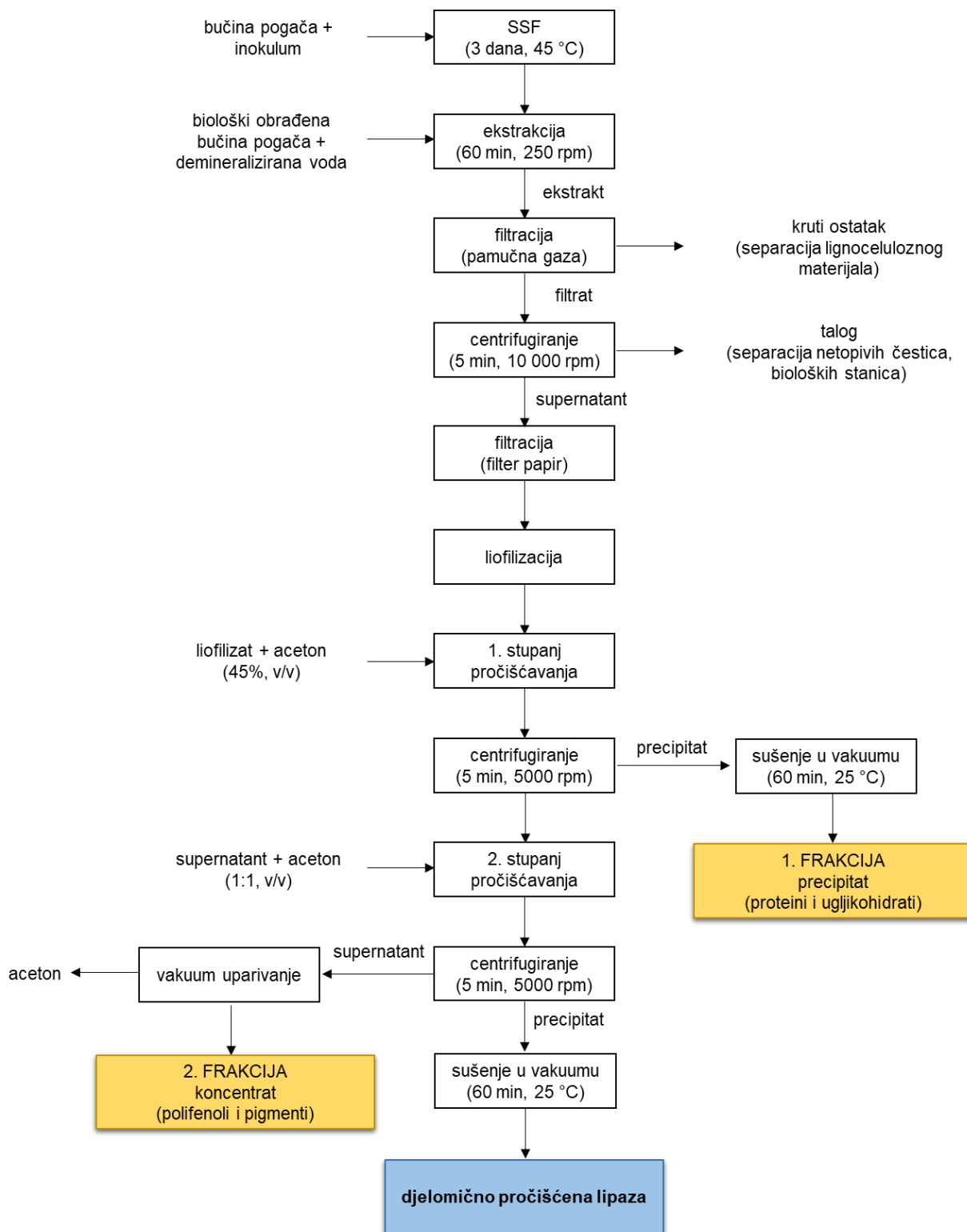
#### 3.2.10.4. Hidroliza ulja katalizirana djelomično pročišćenom lipazom

Proces hidrolize hladno prešanog suncokretovog ulja i otpadnog suncokretovog ulja pomoću djelomično pročišćene TLL proveden je u tamnim staklenim vijalicama ukupnog volumena od 20 cm<sup>3</sup>. U vijalice je odvagano 3,5 g djelomično pročišćene TLL (poglavlje 3.2.10.3.) i 1,3192 g ulja ( $w_{ulje} = 37,69\%$ , w/w). Hidroliza je provedena pri 40 °C u trajanju od 96 sati na magnetnoj miješalici pri 350 rpm. Za svako ulje provedene su dvije paralelne hidrolize. U pravilnim vremenskim intervalima provedeno je uzorkovanje u dvije paralele prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.9.2., te je izračunata konverzija triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina prema formuli (18). Otpadno suncokretovo ulje prikupljeno je nakon pripreme prženih krumpira. Za prženje krumpira korišteno je rafinirano suncokretovo ulje (ZVIJEZDA plus d.o.o., Zagreb, Hrvatska).

Proces hidrolize modelnih supstrata (omegol ulje, hladno prešano ulje konoplje, ekstra djevičansko maslinovo ulje, djevičansko bučino ulje, hladno prešano laneno ulje, rafinirano kokosovo ulje) proveden je na isti način, ali je provedeno jedno uzorkovanje nakon 24 h hidrolize.

#### 3.2.10.5. Kemijska analiza frakcija dobivenih tijekom pročišćavanja sirovog liofiliziranog enzimskog preparata

Tijekom procesa pročišćavanja lipaze iz sirovog liofiliziranog preparata precipitacijom pomoću acetona, osim djelomično pročišćene lipaze, separirane su dvije frakcije (**Slika 14**). Protokol pročišćavanja lipaze objašnjen je u poglavlju 3.2.10.3.



**Slika 14.** Shematski prikaz pročišćavanja lipaze iz sirovog liofiliziranog enzimskog preparata precipitacijom pomoću acetona u dva stupnja

Prva frakcija u obliku precipitata osušena je postupkom liofilizacije. Prije liofilizacije, rezidualni aceton u precipitatu uklonjen je u vakuum sušioniku u trajanju od 60 min pri temperaturi od 25 °C i vakuumu. Prikupljeni precipitat u plastičnoj falkon epruveti zamrznut je na temperaturi od -80 °C (Freezer SWUF-80) kroz 3 sata. Nakon toga, proveden je postupak primarnog sušenja liofilizacijom u trajanju od 19 sati pri tlaku od 0,250 mbar. Nakon primarnog sušenja provedeno je sekundarno sušenje pri tlaku od 0,001 mbar u trajanju od 2 sata. Nakon liofilizacije provedena je kemijska hidroliza precipitata. U staklenu epruvetu odvagana je različita masa liofiliziranog precipitata (od  $0,1 \pm 0,001$  g do  $0,5 \pm 0,001$  g) te je dodano 5 cm<sup>3</sup> sumporne kiseline (1 mol/dm<sup>3</sup>). Nakon otapanja liofiliziranog precipitata provedena je analiza reducirajućih šećera spektrofotometrijski primjenom metode redukcije 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNS metoda) opisana u poglavlju 3.2.11.10. Potom je provedena kiselinska hidroliza uzoraka na temperaturi od 120 °C tijekom 5 sati. Tijekom kemijske hidrolize u pravilnim vremenskim intervalima provedeno je uzorkovanje tako da je automatskom pipetom izuzeto 0,1 cm<sup>3</sup> hidrolizata te je razrijeđen u 0,9 cm<sup>3</sup> hladne demineralizirane vode. Razrjeđenjem sumporne kiseline i hlađenjem dolazi do zaustavljanja kemijske hidrolize. Uzorci su potom analizirani prema opisanom DNS metodom. Analiza reducirajućih šećera u kemijskom hidrolizatu provedena je u tri paralelne probe.

Druga frakcija prikupljena u obliku supernatanta korištena je za analizu ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti. Prije provedbe spektrofotometrijskih analiza, provedeno je uparivanje supernatanta tako da je 200 cm<sup>3</sup> upareno na laboratorijskom rotacijskom vakuum uparivaču do volumena od 50 cm<sup>3</sup>. Uparivanje je provedeno pri temperaturi od 35 °C i ukupnom tlaku od 50 mbar. U koncentriranom uzorku analizirani su ukupni polifenoli (prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.11.14.), ukupni flavonoidi (prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.11.15.) te antioksidacijska aktivnost (prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.11.16.) u tri paralelne probe.

### **3.2.11. Analiza kemijskog sastava bučine pogače**

Analiza kemijskog sastava bučine pogače provedena je u uzorcima prije, tijekom i nakon biološke obrade pomoću *T. lanuginosus* provedenom u laboratorijskim staklenkama (prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4.4.) i bioreaktoru s pliticama (prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.8.2.) tijekom 7 dana. Nakon biološke obrade, uzorci su sterilizirani (15 min, 120 °C), osušeni na sobnoj temperaturi kroz 48 h (udio suhe tvari > 90%) te usitnjeni na laboratorijskom ultracentrifugalnom mlinu (veličina čestica ≤ 1 mm). Do provedbe kemijske analize, uzorci su skladišteni u zamrzivaču na -20 °C. Sve analize provedene su u najmanje 3 ponavljanja.



### 3.2.11.1. Provedba kruto-tekuće ekstrakcije u vodi

U svrhu analize ekstraktibilnih tvari u vodi provedena je kruto-tekuća ekstrakcija na sljedeći način: U laboratorijske tamne bočice odvagano je  $1 \pm 0,001$  g usitnjenog uzorka te je dodano  $25 \text{ cm}^3$  demineralizirane vode. Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji s trešnjom pri temperaturi od  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $170 \text{ rpm}$  u trajanju od 30 minuta. Nakon ekstrakcije uzorci su izbistreni centrifugiranjem ( $5 \text{ min}$ ,  $10\,000 \text{ rpm}$ ). Ekstrakcija je provedena u dvije paralele. U dobivenim vodenim ekstraktima provedeno je određivanje masenog udjela reducirajućih šećera, pojedinačnih šećera UHPLC metodom, masenog udjela proteina Bradfordičinom metodom, masenog udjela topivog ugljika i masenog udjela topivog dušika.

### 3.2.11.2. Provedba kruto-tekuće ekstrakcije u etanolu

U svrhu analize ekstraktibilnih tvari u organskom otapalu (etanol,  $50\% \text{ v/v}$ ) provedena je kruto-tekuća ekstrakcija na sljedeći način: U laboratorijske tamne bočice odvagano je  $1 \pm 0,001$  g usitnjenog uzorka te je dodano  $40 \text{ cm}^3$  etanola ( $50\% \text{ v/v}$ ) razrijeđenog u demineraliziranoj vodi. Ekstrakcija je provedena u vodenoj kupelji s trešnjom pri temperaturi od  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $200 \text{ rpm}$  u trajanju od 120 minuta. Nakon ekstrakcije uzorci su izbistreni centrifugiranjem ( $5 \text{ min}$ ,  $10\,000 \text{ rpm}$ ). Ekstrakcija je provedena u dvije paralele. U dobivenim etanolnim ekstraktima provedeno je određivanje pojedinačnih polifenola UHPLC metodom, masenog udjela ukupnih polifenola, masenog udjela ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti.

### 3.2.11.3. Kvalitativna i kvantitativna analiza N-acetil-D-glukozamina i D-glukozamina

Kemijska analiza *N*-acetil-D-glukozamina i D-glukozamina provedena je prema metodi definiranoj od grupe autora Mohammadi i sur. (2012). Masena koncentracija octene kiseline ( $\gamma_{Ac} [\text{g}/\text{cm}^3]$ ) (ekvivalent *N*-acetil-D-glukozamina) i 2,5-anhidromanoze ( $\gamma_{2,5\text{-anhidroman}} [\text{g}/\text{cm}^3]$ ) (ekvivalent D-glukozamina) kvantificirana je tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (UHPLC). Iz dobivenih masenih koncentracija i volumena kiseline korištene pri analizi ( $V_{H_2SO_4} = 8,7 \text{ cm}^3$ ) izračunata je masa octene kiseline ( $m_{Ac} [\text{g}]$ ) i 2,5-anhidromanoze ( $m_{2,5\text{-anhidroman}} [\text{g}]$ ) prema formulama (20) i (21):

$$m_{Ac} = \gamma_{Ac} \cdot V_{H_2SO_4} \quad (20)$$

$$m_{2,5\text{-anhidroman}} = \gamma_{2,5\text{-anhidroman}} \cdot V_{H_2SO_4} \quad (21)$$

Iz izračunatih masa, relativne molekulske mase octene kiseline ( $Mr_{Ac} = 60,052 \text{ g/mol}$ ) i relativne molekulske mase 2,5-anhidromanoze ( $Mr_{2,5\text{-anhidroman}} = 162,14 \text{ g/mol}$ ) dobivene su množine octene kiseline ( $n_{Ac} [\text{mol}]$ ) i 2,5-anhidromanoze ( $n_{2,5\text{-anhidroman}} [\text{mol}]$ ) prema formulama (22) i (23):

$$n_{Ac} = \frac{m_{Ac}}{Mr_{Ac}} \quad (22)$$

$$n_{2,5\text{-anhidroman}} = \frac{m_{2,5\text{-anhidroman}}}{Mr_{2,5\text{-anhidroman}}} \quad (23)$$

U konačnici, prinos *N*-acetil-D-glukozamina i D-glukozamina izračunati su prema formulama (24) i (25) (Zamani i sur, 2008):

$$Y_{N\text{-AcGlc}} = \frac{n_{Ac} \cdot Mr_{N\text{-AcGlc}}}{R_{N\text{-AcGlc}} \cdot m_{uz}} \quad (24)$$

$$Y_{Glc} = \frac{\frac{n_{2,5\text{-anhidroman}}}{R_{Glc}} - \frac{n_{Ac}}{R_{N\text{-AcGlc}}}}{m_{uz}} \cdot Mr_{Glc} \quad (25)$$

gdje je:  $Y_{N\text{-AcGlc}}$  = prinos *N*-acetil-D-glukozamina [-]

$n_{Ac}$  = množina octene kiseline [mol]

$Mr_{N\text{-AcGlc}}$  = relativna molekulska masa *N*-acetil-D-glukozamina [203 g/mol]

$R_{N\text{-AcGlc}}$  = ukupni iscrpak *N*-acetil-D-glukozamina iz hitina [0,953 g/g]

$m_{uz}$  = masa uzorka [g]

$Y_{Glc}$  = prinos D-glukozamina [-]

$n_{2,5\text{-anhidroman}}$  = množina 2,5-anhidromanoze [mol]

$R_{Glc}$  = ukupni iscrpak D-glukozamina iz hitina [0,920 g/g]

$Mr_{Glc}$  = relativna molekulska masa D-glukozamina [161 g/mol]

#### 3.2.11.4. Kvalitativna i kvantitativna analiza ergosterola

Kemijska analiza ergosterola provedena je prema metodi razvijenoj od grupe autora Barreira i sur. (2014) uz modifikacije. Nakon provedene ekstrakcije lipofilnih komponenti (prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.11.5.) u dobivene ekstrakte dodano je 2 cm<sup>3</sup> vodene otopine askorbinske kiseline

(1 mol/dm<sup>3</sup>) i 10 cm<sup>3</sup> otopine kalijeva hidroksida u etanolu (2 mol/dm<sup>3</sup>). Saponifikacija uzoraka provedena je u vodenoj kupelji s trešnjom (45 min, 60 °C, 125 rpm). Uzorci su potom ohlađeni na sobnu temperaturu, profiltrirani (filter papir, Munktell 21/N) i kvantitativno preneseni u staklene epruvete uz ispiranje zaostalog uzorka s posuđa i filter papira pomoću 2 cm<sup>3</sup> apsolutnog etanola. U uzorke je potom dodano 2,5 cm<sup>3</sup> vodene otopine natrijeva klorida (100 mg/cm<sup>3</sup>) i 5 cm<sup>3</sup> *n*-heksana. Uzorci su miješani 1 minutu na vrtložnoj miješalici. Nakon separacije vodene i organske frakcije, gornja frakcija *n*-heksana odvojena je automatskom pipetom te prenesena u epruvetu s bezvodnim natrijevim sulfatom (dodan vrhom špatule). Tekuće-tekuća ekstrakcija sterola iz vodene frakcije ponovljena je 2 puta po 5 cm<sup>3</sup> *n*-heksana. Frakcije *n*-heksana su profiltrirane (filter papir, Munktell 21/N) u okruglu tikvicu te uparene na laboratorijskom rotacijskom vakuumparivaču. Suhi ostatak rekonstituiran je u 2 cm<sup>3</sup> metanola (HPLC čistoće), profiltriran (filter za šprice veličine pora 0,45 μm, Chromafil Xtra PTFE) te korišteni za UHPLC kvalitativnu i kvantitativnu analizu prema prethodno publiciranoj kromatografskoj metodi (Šelo i sur., 2023). Kvantificirana masena koncentracija ergosterola ( $\gamma_{\text{ergosterol}}$  [mg/cm<sup>3</sup>]) i volumen metanola u kojemu je rekonstituiran ergosterol ( $V_{\text{MeOH}} = 2 \text{ cm}^3$ ) korišteni su za izračun masene koncentracije ergosterola ( $C_{\text{ergosterol}}$  [mg/g<sub>ulje</sub>]) izražen na masu ulja ( $m_{\text{ulje}}$  [g]) korišten za analizu prema formuli (26):

$$C_{\text{ergosterol}} = \frac{\gamma_{\text{ergosterol}} \cdot V_{\text{MeOH}}}{m_{\text{ulje}}} \quad (26)$$

### 3.2.11.5. Određivanje masenog udjela slobodnih masti

Analiza masenog udjela slobodnih masti u uzorcima provedena je prema prethodno publiciranoj metodi (Seo i sur., 2017). Ekstrakcija je provedena pomoću univerzalnog sustava za ekstrakciju (Buchi B-811) primjenom *n*-heksana kao organskog otapala u trajanju od 2 sata. Nakon provedene ekstrakcije, uzorci su osušeni u vakuum sušioniku (15 min, 45 °C), ohlađeni u eksikatoru te je određena masa ekstraktibilne lipofilne frakcije. Maseni udio ulja izražen na masu suhe tvari uzorka korištenog za ekstrakciju izračunat je prema formuli (27):

$$w_{\text{ulje}} = \frac{m_{\text{ulje}}}{m_{\text{uz}} \cdot \left(\frac{w_{\text{st}}}{100}\right)} \cdot 100 \quad (27)$$

gdje je:  $w_{\text{ulje}}$  = maseni udio ulja izražen na masu suhe tvari uzorka [%<sub>st</sub>]

$m_{\text{ulje}}$  = masa ulja [g]

$m_{uz}$  = masa uzorka [g]

$w_{st}$  = udio suhe tvari [%]

#### 3.2.11.6. Određivanje masenog udjela sirovih proteina po Kjeldahlu

Analiza masenog udjela sirovih proteina u uzorcima provedena je prema Kjeldahl metodi (AOAC, 2002). Udio proteina u uzorcima ( $w_{protein}$  [%<sub>st</sub>]) izračunat je na masu suhe tvari u uzorku prema formuli (28). Korišteni faktor za izračun masenog udjela bjelančevina iznosio je 5,3 (Jones, 1931).

$$w_{protein} = \frac{N \cdot f}{w_{st}} * 100 \quad (28)$$

gdje je:  $w_{protein}$  = maseni udio proteina izražen na suhu tvar uzorka [%<sub>st</sub>]

$N$  = količina dušika [%]

$f$  = faktor za izračun udjela bjelančevina prema udjelu dušika (5,3)

$w_{st}$  = udio suhe tvari [%]

#### 3.2.11.7. Određivanje masenog udjela ukupnog ugljika u krutim uzorcima

Analiza masenog udjela ukupnog ugljika provedena je prema prethodno publiciranoj metodi primjenom analizatora ukupnog ugljika (SSM-5000A, Shimadzu) (Šelo i sur., 2022). Udio ukupnog organskog ugljika u uzorcima ( $w_{TOC}$  [%<sub>st</sub>]) izračunat je kao razlika udjela ukupnog ugljika ( $w_{TC}$  [%<sub>st</sub>]) i anorganskog ugljika ( $w_{IC}$  [%<sub>st</sub>]). U uzorcima nije detektiran anorganski ugljik, čime vrijedi jednakost  $w_{TOC} = w_{TC}$ . Udio ukupnog organskog ugljika u uzorcima izračunat je na masu suhe tvari u uzorku prema formuli (29):

$$w_{TOC} = \frac{w_{TC}}{w_{st}} \cdot 100 \quad (29)$$

#### 3.2.11.8. Određivanje masenog udjela sirovih vlakana

Analiza udjela sirovih vlakana provedena je prema Van Soest metodi (Goering i Van Soest, 1970) pomoću uređaja za određivanje sirovih vlakana (VELP). Rezultati analize izračunati su na udio suhe tvari uzorka kao maseni udio neutralnih deterdžent vlakna ( $w_{NDF}$  [%<sub>st</sub>]), maseni udio kiselih deterdžent vlakna ( $w_{ADF}$  [%<sub>st</sub>]) i maseni udio kiselog deterdženta lignina ( $w_{ADL}$  [%<sub>st</sub>]). Iz dobivenih

rezultata izračunat je maseni udio hemiceluloze ( $w_{\text{hemiceluloza}} [\%_{\text{st}}]$ ), maseni udio celuloze ( $w_{\text{celuloza}} [\%_{\text{st}}]$ ) i masni udio lignina ( $w_{\text{lignin}} [\%_{\text{st}}]$ ) prema formulama (30), (31) i (32):

$$w_{\text{hemiceluloza}} = w_{\text{NDF}} - w_{\text{ADF}} \quad (30)$$

$$w_{\text{celuloza}} = w_{\text{ADF}} - w_{\text{ADL}} \quad (31)$$

$$w_{\text{lignin}} = w_{\text{ADL}} \quad (32)$$

### 3.2.11.9. Određivanje masenog udjela pepela

Udio pepela u uzorcima određen je prema AACC-08-03 metodi (AOAC, 1995). Maseni udio pepela izražen na masu suhe tvari uzorka izračunat je prema formuli (33):

$$w_{\text{pepeo}} = \frac{m_{\text{pepeo}}}{m_{\text{uz}} \cdot \left(\frac{w_{\text{st}}}{100}\right)} \cdot 100 \quad (33)$$

gdje je:  $w_{\text{pepeo}}$  = maseni udio pepela izražen na masu suhe tvari uzorka [%<sub>st</sub>]

$m_{\text{pepeo}}$  = masa pepela [g]

$m_{\text{uz}}$  = masa uzorka [g]

$w_{\text{st}}$  = udio suhe tvari [%]

### 3.2.11.10. Određivanje masenog udjela reducirajućih šećera

Analiza reducirajućih šećera u prethodno pripremljenim ekstraktima (poglavlje 3.2.11.1.) provedena je spektrofotometrijski prema prethodno publiciranoj metodi (Miller, 1959). Masena koncentracija reducirajućih šećera ( $\gamma_{\text{DNS}} [\text{mg}/\text{cm}^3]$ ) izračunata je iz jednadžbe baždarnog pravca (formula (34)) nakon izmjerene apsorbancije uzorka pri valnoj duljini od 540 nm ( $A_{540} [\text{nm}]$ ). Za konstruiranje baždarnog pravca korišten je standard glukoze.

$$\gamma_{\text{DNS}} = 0,3353 \cdot A_{540} + 0,0211 \quad (34)$$

Iz dobivene masene koncentracije reducirajućih šećera izračunat je maseni udio reducirajućih šećera prema formuli (35):

$$C_{DNS} = \frac{\gamma_{DNS} \cdot V_{eks} \cdot FR}{m_{uz} \cdot \left(\frac{w_{st}}{100}\right)} \quad (35)$$

- gdje je:
- $C_{DNS}$  = maseni udio reducirajućih šećera izmjeren DNS metodom [mg/g<sub>st</sub>]
  - $\gamma_{DNS}$  = masena koncentracija reducirajućih šećera izmjerena DNS metodom [mg/cm<sup>3</sup>]
  - $V_{eks}$  = volumen ekstrakta [cm<sup>3</sup>]
  - $FR$  = faktor razrjeđenja [-]
  - $m_{uz}$  = masa uzorka [g]
  - $w_{st}$  = udio suhe tvari [%]

#### 3.2.11.11. Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih šećera UHPLC metodom

Kvantifikacija pojedinačnih šećera (DL-arabinoza, D(+)-saharoza, D(-)-fruktoza, D(+)-glukoza) u prethodno pripremljenim ekstraktima (poglavlje 3.2.11.1.) provedena je UHPLC metodom prema prethodno publiciranoj metodi (Martinović i sur., 2023). Separacija ispitnih analita provedena je pomoću kromatografskih kolona Aminex® HPX column (HPX-87H, 300 × 7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD) i Nucleogel® Sugar Pb column (VA, 300 × 7.8 mm, Macherey-Nagel GmbH i Co. KG, Dueren, Njemačka). Detekcija pojedinih analita provedena je pomoću RID detektora. Kvalitativna analiza ispitnog analita provedena je usporedbom retencijskog vremena sa standardom poznatog sastava, te injektiranjem standarda poznatog sastava u ispitni uzorak. Kvantitativna analiza ispitnog analita provedena je pomoću prethodno konstruiranih baždarnih pravaca. Obrada rezultata provedena je primjenom LabSolutions programa (verzija 5.87). Iz dobivene masene koncentracija pojedinog šećera ( $\gamma_{šećer}$ , [mg/cm<sup>3</sup>]) izračunat je maseni udio pojedinog šećera ( $C_{šećer}$ , [mg/g<sub>st</sub>]) prema formuli (36):

$$C_{šećer} = \frac{\gamma_{šećer} \cdot V_{eks}}{m_{uz} \cdot \left(\frac{w_{st}}{100}\right)} \quad (36)$$

#### 3.2.11.12. Određivanje masenog udjela proteina Bradfordičinom metodom

Analiza količine ekstraktibilnih proteina u prethodno pripremljenim ekstraktima (poglavlje 3.2.11.1.) provedena je Bradfordičinom metodom prema metodi objašnjenj u poglavlju 3.2.4.5.

Iz dobivene masene koncentracije proteina ( $\gamma_{\text{protein}}$ , [mg/cm<sup>3</sup>]) izračunat je maseni udio ekstraktibilnih proteina ( $C_{\text{protein}}$ , [mg/g<sub>st</sub>]) prema formuli (37):

$$C_{\text{protein}} = \frac{\gamma_{\text{protein}} \cdot V_{\text{eks}} \cdot FR}{m_{\text{uz}} \cdot \left(\frac{W_{\text{st}}}{100}\right)} \quad (37)$$

### 3.2.11.13. Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinačnih polifenola UHPLC metodom

Kvantifikacija pojedinačnih polifenola ((-)-epikatehin, (+)-katehin, epikatehin galat, elaginska kiselina, ferulinska kiselina, galna kiselina, galokatehin galat, kaempferol, kafeinska kiselina, o-kumarinska kiselina, p-hidroksibenzojeva kiselina, p-kumarinska kiselina, rutin, siringinska kiselina, procijanidin B1, procijanidin B2, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, kvercetin) u prethodno pripremljenim ekstraktima (poglavlje 3.2.11.2.) provedena je UHPLC metodom prema prethodno publiciranoj metodi (Martinović i sur., 2023). Separacija ispitnih analita provedena je pomoću kromatografske kolone Kinetex® C18 core-shell (100 × 4.6 mm, 2.6 μm, Phenomenex, Torrance, CA, SAD). Detekcija pojedinih analita provedena je pomoću PDA detektora. Kvalitativna analiza ispitnog analita provedena je usporedbom retencijskog vremena sa standardom poznatog sastava, te injektiranjem standarda poznatog sastava u ispitni uzorak. Kvantitativna analiza ispitnog analita provedena je pomoću prethodno konstruiranih baždarnih pravaca. Obrada rezultata provedena je primjenom LabSolutions programa (verzija 5.87). Iz dobivene masene koncentracije ( $\gamma_{\text{polifenol}}$ , [mg/cm<sup>3</sup>]) izračunat je maseni udio pojedinog polifenola ( $C_{\text{polifenol}}$ , [μg/g<sub>st</sub>]) prema formuli (38):

$$C_{\text{polifenol}} = \frac{\gamma_{\text{polifenol}} \cdot V_{\text{eks}}}{m_{\text{uz}} \cdot \left(\frac{W_{\text{st}}}{100}\right)} \quad (38)$$

### 3.2.11.14. Određivanje masenog udjela ukupnih polifenola spektrofotometrijski

Analiza masenog udjela ukupnih polifenola u prethodno pripremljenim ekstraktima (poglavlje 3.2.11.2.) provedena je spektrofotometrijski prema prethodno publiciranoj metodi (Martinović i sur., 2023). Masena koncentracija ukupnih polifenola ( $\gamma_{\text{UP}}$  [mg/cm<sup>3</sup>]) izračunata je iz jednadžbe baždarnog pravca (formula (39)) nakon izmjerene apsorbancije uzorka pri valnoj duljini od 765 nm ( $A_{765}$  [nm]). Za konstruiranje baždarnog pravca korišten je standard galna kiselina monohidrat (98+% A.C.S. reagent).

$$\gamma_{UP} = 1,0188 \cdot A_{765} + 0,018 \quad (39)$$

Iz dobivene masene koncentracije ukupnih polifenola izračunat je maseni udio ukupnih polifenola (ekvivalent galne kiseline) ( $C_{UP}$ , [mg<sub>GK</sub>/g<sub>st</sub>]) prema formuli (40):

$$C_{UP} = \frac{\gamma_{UP} \cdot V_{eks} \cdot FR}{m_{uz} \cdot \left(\frac{W_{st}}{100}\right)} \quad (40)$$

#### 3.2.11.15. Određivanje masenog udjela ukupnih flavonoida spektrofotometrijski

Analiza količine ukupnih flavonoida u prethodno pripremljenim ekstraktima (poglavlje 3.2.11.2.) provedena je spektrofotometrijski prema prethodno publiciranoj metodi (Martinović i sur., 2023). Masena koncentracija ukupnih flavonoida ( $\gamma_{UF}$  [mg/cm<sup>3</sup>]) izračunata je iz jednadžbe baždarnog pravca (formula (41)) nakon izmjerene apsorbancije uzorka pri valnoj duljini od 510 nm ( $A_{510}$  [nm]). Za kreiranje baždarnog pravca korišten je standard (+)-katehin.

$$\gamma_{UF} = 0,3267 \cdot A_{510} + 0,0056 \quad (41)$$

Iz dobivene masene koncentracije ukupnih flavonoida izračunat je maseni udio ukupnih flavonoida (ekvivalent katehina) ( $C_{UF}$ , [mg<sub>KA</sub>/g<sub>st</sub>]) prema formuli (42):

$$C_{UF} = \frac{\gamma_{UF} \cdot V_{eks} \cdot FR}{m_{uz} \cdot \left(\frac{W_{st}}{100}\right)} \quad (42)$$

#### 3.2.11.16. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Određivanje antioksidacijske aktivnosti prethodno pripremljenih ekstrakta (poglavlje 3.2.11.2.) provedena je spektrofotometrijski na temelju inhibicije radikala (DPPH•) prema prethodno publiciranoj metodi (Bucić-Kojić i sur., 2009). Postotak inhibicije radikala (DPPH•<sub>inhibicija</sub>, [%]) izračunat je prema formuli (43) kao razlika apsorbancije otopine DPPH• ( $A_{DPPH}$ ) te apsorbancija otopine DPPH• očitana nakon inkubacije uz dodatak ekstrakta ( $A_{DPPH,EK}$ ). Spektrofotometrijsko mjerenje provedeno je pri valnoj duljini od 515 nm.

$$DPPH_{inhibicija}^{\bullet} = \frac{A_{DPPH} - A_{DPPH,EK}}{A_{DPPH}} \quad (43)$$



Postotak inhibiranog DPPH• radikala preračunat je na ekvivalent masene koncentracije antioksidansa troloxa ( $\gamma_{trolox}$ , [mg/cm<sup>3</sup>]) prema jednadžbi baždarnog pravca (formula (44)) (Martinović i sur., 2023):

$$\gamma_{trolox} = 0,0035 \cdot DPPH_{inhibicija}^* + 0,0038 \quad (44)$$

U konačnici, iz masene koncentracije ekvivalenta troloxa izračunata je antioksidacijska aktivnosti ( $AA_{trolox}$ , [mg<sub>trolox</sub>/g<sub>st</sub>]) uzorka izražena na masu suhe tvari prema formuli (45):

$$AA_{trolox} = \frac{\gamma_{trolox} \cdot V_{eks} \cdot FR}{m_{uz} \cdot \left(\frac{w_{st}}{100}\right)} \quad (45)$$

### 3.2.11.17. Određivanje masenog udjela topivog ugljika i dušika

Analiza količine ukupnog topivog organskog ugljika i topivog dušika u prethodno pripremljenim ekstraktima (poglavlje 3.2.11.1.) provedena je metodom katalitičke oksidacije pri 680 °C pomoću analizatora ugljika i dušika (TOC-L<sub>CPH/CPN</sub>). Iz dobivenih masenih koncentracija topivog organskog ugljika ( $\gamma_{TOC}$ , [mg/cm<sup>3</sup>]) i masenih koncentracija topivog dušika ( $\gamma_{TN}$ , [mg/cm<sup>3</sup>]) izračunati su maseni udio topivog organskog ugljika ( $C_{TOC}$ , [mg/g<sub>st</sub>]) i maseni udio topivog dušika ( $C_{TN}$ , [mg/g<sub>st</sub>]) prema formulama (46) i (47):

$$C_{TOC} = \frac{\gamma_{TOC} \cdot V_{eks} \cdot FR}{m_{uz} \cdot \left(\frac{w_{st}}{100}\right)} \quad (46)$$

$$C_{TN} = \frac{\gamma_{TN} \cdot V_{eks} \cdot FR}{m_{uz} \cdot \left(\frac{w_{st}}{100}\right)} \quad (47)$$

### 3.2.11.18. Analiza i procjena zdravstvene ispravnosti bučine pogače

Analiza i procjena zdravstvene ispravnosti uzoraka (bučina pogača, inokulirana bučina pogača s inokulumom pripremljenim uzgojem *T. lanuginosus* na repinim rezancima te biološki obrađen supstrat nakon provedenog SSF procesa u bioreaktoru s pliticama u trajanju od tri dana) provedene su od akreditiranog laboratorija prema odgovarajućoj metodi. Parametri ispitivanja, metode ispitivanja i tehnike ispitivanja navedeni su u **Tablicama 12 – 16**.

**Tablica 12.** Popis kemijskih ispitivanja provedenih u uzorcima bučine pogače

Parametar ispitivanja	Metoda ispitivanja	Tehnika ispitivanja
Nitriti	RU-308-01	HPLC
Nitrati	RU-308-01	HPLC
Bruto energija	HRN EN ISO 9831:2004	Kalorimetrijska metoda
Amonijski dušik	RU-431-01	-
Octena kiselina	RU-020-03	-
Maslačna kiselina	RU-020-03	-
Mliječna kiselina	RU-020-03	-

**Tablica 13.** Popis korištenih metoda za određivanje udjela metala i metaloida u uzorcima bučine pogače

Parametar ispitivanja	Metoda ispitivanja	Tehnika ispitivanja
Fosfor (P)	HRN ISO 6491:2001 *	spektrofotometrijski
Kalcij (Ca)	RU-305-05 **	ICP-MS
Kalij (K)	RU-305-05	ICP-MS
Željezo (Fe)	RU-305-05	ICP-MS
Olovo (Pb)	RU-305-05 **	ICP-MS
Kadmij (Cd)	RU-305-05 **	ICP-MS
Arsen (As)	RU-305-05 **	ICP-MS

\* - akreditirana metoda prema HRN EN ISO/IEC 17025:2017

\*\* - akreditirana metoda u fleksibilnom području prema HRN EN ISO/IEC 17025:2017

**Tablica 14.** Popis korištenih metoda za određivanje udjela nepoželjnih tvari (mikotoksina) u uzorcima bučine pogače

Parametar ispitivanja	Metoda ispitivanja	Tehnika ispitivanja
Aflatoksin B1	RU-287-04 **	LC-MS/MS
Aflatoksin B2	RU-287-04 **	LC-MS/MS
Aflatoksin G1	RU-287-04 **	LC-MS/MS
Aflatoksin G2	RU-287-04 **	LC-MS/MS
Aflatoksini ukupni	RU-287-04 **	LC-MS/MS
Deoksinivalenol	RU-287-04 **	LC-MS/MS

Fumonizin B1	RU-287-04 **	LC-MS/MS
Fumonizin B2	RU-287-04 **	LC-MS/MS
Fumonizini	RU-287-04 **	LC-MS/MS
Zearalenon	RU-287-04 **	LC-MS/MS
T-2 toksin	RU-287-04 **	LC-MS/MS
HT-2 toksin	RU-287-04 **	LC-MS/MS
Zbroj T-2 i HT-2	RU-287-04 **	LC-MS/MS
Okratoksin A	RU-287-04 **	LC-MS/MS

\*\* - akreditirana metoda u fleksibilnom području prema HRN EN ISO/IEC 17025:2017

**Tablica 15.** Popis korištenih metoda za određivanje udjela nepoželjnih tvari (alkaloidi) u uzorcima bučine pogače

Parametar ispitivanja	Metoda ispitivanja	Tehnika ispitivanja
<b>ERGOT ALKALOIDI</b>		
Ergokristinin	RU-149-04	LC-MS/MS
Ergokristin	RU-149-04	LC-MS/MS
Ergotaminin	RU-149-04	LC-MS/MS
Ergotamin	RU-149-04	LC-MS/MS
Ergokriptinin	RU-149-04	LC-MS/MS
á Ergokriptin	RU-149-04	LC-MS/MS
Ergokorninin	RU-149-04	LC-MS/MS
Ergokornin	RU-149-04	LC-MS/MS
Ergozinin	RU-149-04	LC-MS/MS
Ergozin	RU-149-04	LC-MS/MS
Ergometrinin	RU-149-04	LC-MS/MS
Ergometrin	RU-149-04	LC-MS/MS
Ukupni ergot alkaloidi	RU-149-04	LC-MS/MS
<b>TROPAN ALKALOIDI</b>		
Atropin	RU-418-01	LC-MS/MS
Skopolamin	RU-418-01	LC-MS/MS

**Tablica 16.** Popis korištenih metoda za određivanje udjela nepoželjnih tvari (PCB i PAH) u uzorcima bučine pogače

Parametar ispitivanja	Metoda ispitivanja	Tehnika ispitivanja
POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB)		
PCB ukupni	RU-231-04	GC-MS/MS
PCB 28	RU-231-04	GC-MS/MS
PCB 52	RU-257-01	GC-MS/MS
PCB 101	RU-231-04	GC-MS/MS
PCB 118	RU-231-04	GC-MS/MS
PCB 138	RU-257-01	GC-MS/MS
PCB 153	RU-257-01	GC-MS/MS
PCB 180	RU-257-01	GC-MS/MS
POLIČIKLIČKI AROMATSKI UGLJIKOVODICI (PAH)		
Benz(a)antracen	RU-230-03	GC-MS/MS
Benzo(a)piren	RU-230-03	GC-MS/MS
Krizen	RU-230-03	GC-MS/MS
Benzo(b)fluoranten	RU-256-02	GC-MS/MS
Zbroj benzo(a)pirena, benz(a)antracena, benzo(b)fluorantena i krizena	RU-256-02	GC-MS/MS

### 3.2.12. Procjena održivosti procesa proizvodnje i pročišćavanja lipaze

U svrhu procjene održivosti predloženog procesa proizvodnje i pročišćavanja lipaze, proveden je izračun za *E-faktor* [g/g] (engl. *ecological factor*), *MI* vrijednost [g/g] (engl. *mass intensity*) i *PMI* vrijednost [g/g] (engl. *process mass intensity*) prema formulama (48), (49) i (50) (Roschangar i sur., 2015):

$$E\text{-faktor} = \frac{m_{\text{otpad}}}{m_{\text{produkt}}} \quad (48)$$

$$MI = \frac{m_{\text{bučina pogača}} + m_{\text{inokulum}} + m_{\text{aceton}} + m_{\text{pufer}}}{m_{\text{produkt}}} \quad (49)$$

$$PMI = \frac{m_{\text{bučina pogača}} + m_{\text{inokulum}} + m_{\text{aceton}} + m_{\text{pufer}} + m_{\text{voda}}}{m_{\text{produkt}}} \quad (50)$$

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKI TEST ZA MJERENJE AKTIVNOSTI LIPAZE IZ *T. LANUGINOSUS*

U svrhu razvoja brzog spektrofotometrijskog testa za mjerenje aktivnosti lipaze, ispitan je utjecaj koncentracije TLL, koncentracije supstrata, pH reakcijskog medija, vrste i koncentracije organskog otapala te vrste i koncentracije emulgatora na hidrolitičku aktivnost TLL, koristeći *p*NP-palmitat kao supstrat. Rezultati mjerenja prikazani su tablično i grafički u sljedećim poglavljima.

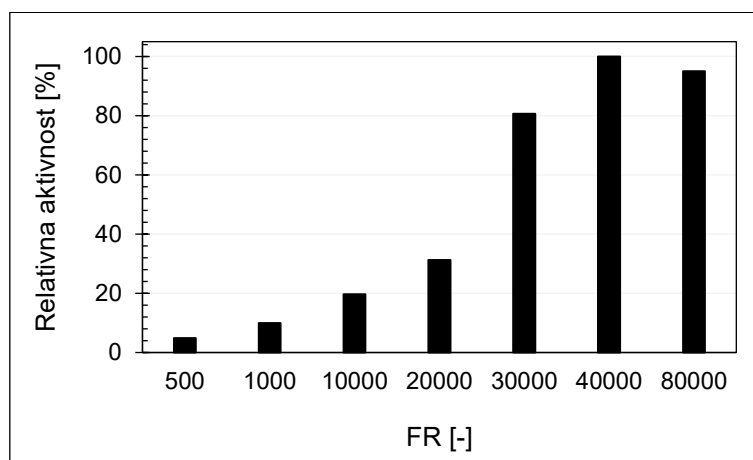
Prije provedbe razvoja testa, na temelju dostupne literature (Palacios i sur., 2014) definirani su početni reakcijski uvjeti opisani u poglavlju 3.2.3.1. Kao supstrat za enzim korišten je *p*NP-palmitat. Zbog lipofilne komponente (palmitinske kiseline), supstrat je otopljen u izopropanolu. Osim što je *p*NP-palmitat jedan od supstrata koji je najčešće korišten za mjerenje hidrolitičke aktivnosti lipaze, navedeni supstrat odabran je zato što je palmitinska kiselina viša masna kiselina (C16:0) zastupljena u mnogim uljima, a uspješnost proizvedene lipaze bit će testirana u procesima hidrolize odabranih ulja. Nadalje, reakcijska smjesa pripremljena je miješanjem otopine supstrata u izopropanolu (organska faza) s puferom (vodena faza) u kojemu je prethodno otopljen odgovarajući emulgator. Prilikom definiranja početnih reakcijskih uvjeta, guma arabika (0,4% w/v) korištena je kao emulgator. Udio izopropanola u reakcijskoj smjesi bio je konstantan te je iznosio 5,33% (v/v).

Razvoj testa temeljio se na mjerenju početne reakcijske brzine hidrolize esterske veze u molekuli *p*NP-palmitata, pri čemu nastaju produkti palmitinska kiselina i *p*-nitrofenol (koji daje žuto obojenje). Intenzitet žutog obojenja, koji je direktno proporcionalan koncentraciji oslobođenog *p*-nitrofenola, određen je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 440 nm kao promjena apsorbancije u vremenu te je na osnovi dobivenog podatka izračunata volumna aktivnost TLL prema formuli (1). Valna duljina, na kojoj produkt reakcije (*p*-nitrofenol) daje maksimalni odaziv, određena je snimanjem karakterističnog spektra reakcijske smjese nakon provedene enzimске hidrolize *p*NP-palmitata.

### 4.1.1. Utjecaj koncentracije enzima na početnu reakcijsku brzinu

U prvom dijelu razvoja testa za mjerenje aktivnosti lipaze, ispitan je utjecaj koncentracije TLL na hidrolizu supstrata (*p*NP-palmitata). Prema dobivenim rezultatima (**Slika 15**) vidljivo je da koncentracija TLL u reakcijskoj smjesi značajno utječe na brzinu hidrolize supstrata. Najveća hidrolitička aktivnost lipaze zabilježena je pri faktoru razrjeđenja od 40 000 (koncentracija proteina u reakcijskoj smjesi određena Bradfordičinom metodom:  $\gamma_{\text{protein}} = 6,8 \cdot 10^{-4} \text{ mg/cm}^3$ ). Navedene

tvrdnje mogu se objasniti činjenicom da TLL u vodenim otopinama ima tendenciju međusobne agregacije što rezultira formiranjem smjese monomera i dimera enzima. Prisutnost lipaze u vodenom mediju, čak i u maloj koncentraciji, može rezultirati međusobnim povezivanjem enzima preko njihovih aktivnih mjesta (Palomo i sur., 2003). Posljedično tomu, povećanje koncentracije lipaze u vodenom mediju inicira formiranje bimolekularnih agregata što rezultira redukcijom hidrolitičke aktivnosti TLL.

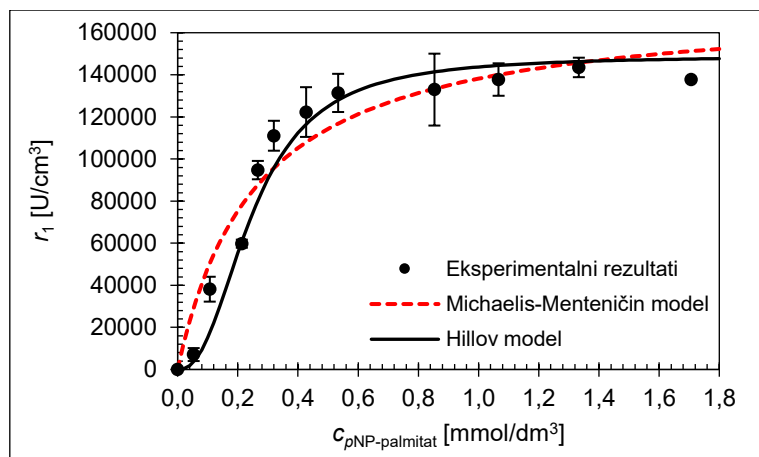


**Slika 15.** Relativna aktivnost lipaze izmjerena pri različitom faktoru razrjeđenja (FR) komercijalne otopine lipaze

#### 4.1.2. Ovisnost volumne aktivnosti lipaze o koncentraciji supstrata

Nakon definirane optimalne koncentracije TLL u reakcijskoj smjesi, ispitan je utjecaj koncentracije *p*NP-palmitata na početnu reakcijsku brzinu TLL. Prema dobivenim rezultatima (**Slika 16**) može se zaključiti da povećanje koncentracije supstrata u reakcijskoj smjesi od 0,05 mmol/dm<sup>3</sup> do 0,53 mmol/dm<sup>3</sup> značajno utječe na hidrolitičku aktivnost TLL. Daljnjim povećanjem koncentracije supstrata nije došlo do promjene hidrolitičke aktivnosti TLL što znači da nije došlo do inhibicije lipaze supstratom. Također, provedbom eksperimenta u kojemu je umjesto enzima dodan isti volumen pufera (slijepa proba) zaključeno je da nije došlo do spontane hidrolize supstrata. Dobiveni eksperimentalni podaci aproksimirani su pomoću Michaelis-Menteničinog (formula (3)) i Hillvog modela (formula (4)), procijenjeni su kinetički parametri ( $K_m$ ,  $V_m$ ) i ispitana je prikladnost modela (MSC) (**Tablica 19**).





**Slika 16.** Ovisnost volumne aktivnosti lipaze o koncentraciji supstrata (otopine supstrata pripremljene u izopropanolu; volumni udio organskog otapala u reakcijskoj smjesi 5,33%; maseni udio gume arabike u reakcijskoj smjesi 0,4%; TRIS-HCl pufer pH = 8)

#### 4.1.3. Utjecaj pH na početnu reakcijsku brzinu

Rezultati mjerenja početne reakcijske brzine hidrolize supstrata katalizirane pomoću lipaze pri različitim pH prikazani su u **Tablici 17**. Molarnost korištenih pufera iznosila je 50 mmol/dm<sup>3</sup> zato što je zabilježena autohidroliza supstrata primjenom pufera veće molarnosti (100 mmol/dm<sup>3</sup>). Najveća reakcijska brzina hidrolize pNP-palmitata zabilježena je primjenom TRIS-HCl pufera pH 9 za pripremu reakcijske smjese. Navedeni rezultati u skladu su s literaturnim podacima (Zheng i sur., 2011). Budući da je za izračun aktivnosti enzima (formula (1)) potrebno uzeti u obzir molarni ekstinkcijski koeficijent  $\epsilon$  (koji je ovisan o kemijskim svojstvima medija), u **Tablici 17** prikazane su vrijednosti dobivene za  $\epsilon$  odgovarajuće pH vrijednosti.

**Tablica 17.** Utjecaj pH na početnu reakcijsku brzinu TLL

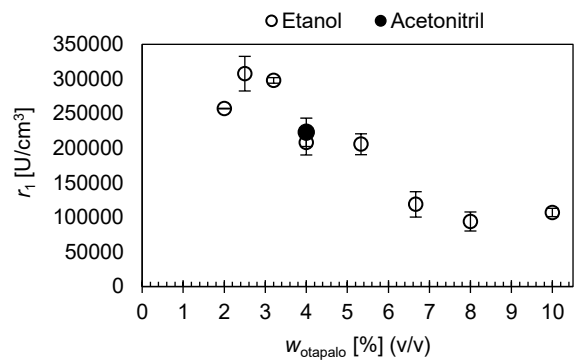
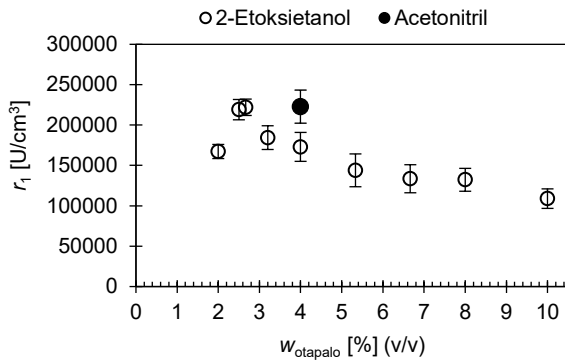
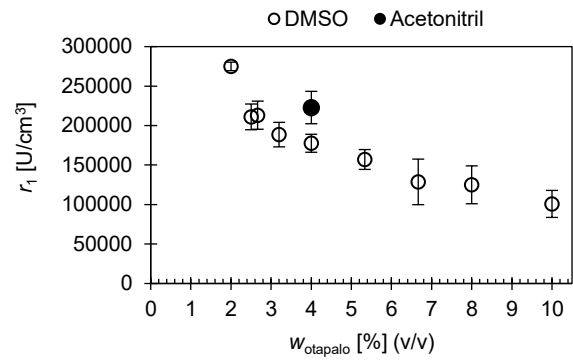
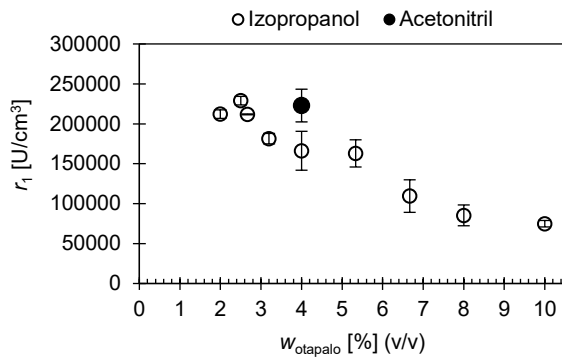
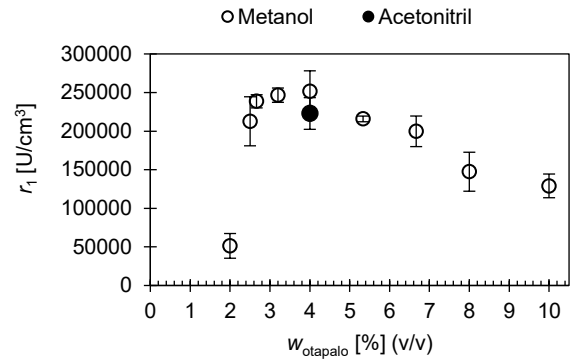
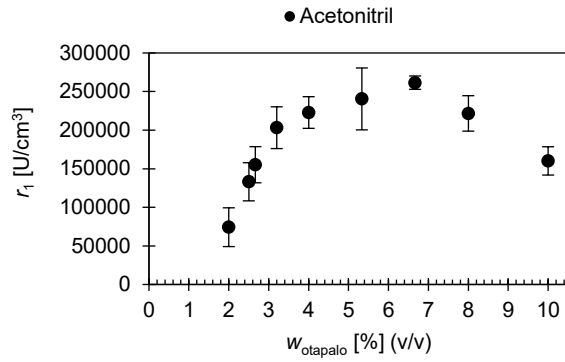
pufer	pH	$r_1$ [U/cm <sup>3</sup> ]	$\epsilon$ [dm <sup>3</sup> /(mmol cm)]
natrij-fosfatni pufer	7	45791 ± 2032	1,7909
TRIS-HCl	8	139860 ± 20321	2,4488
TRIS-HCl	9	192432 ± 21938	2,6159
TRIS-HCl	10	112929 ± 11832	3,0003

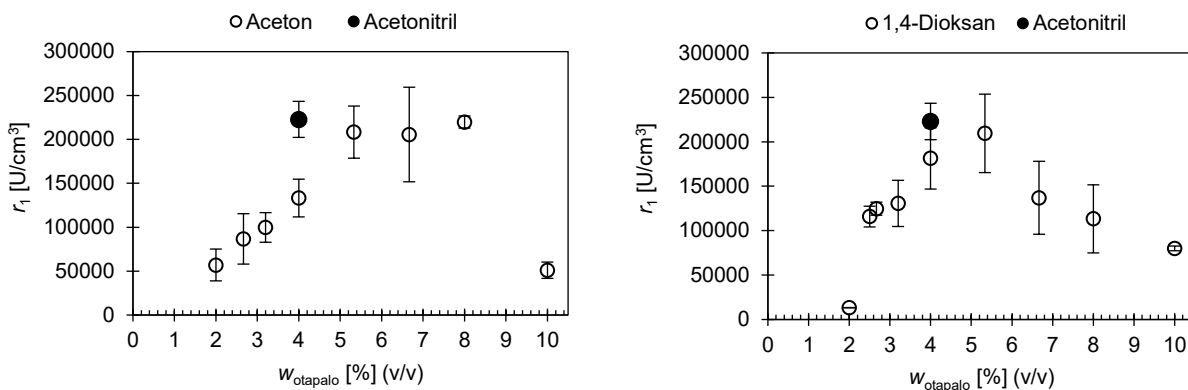
#### 4.1.4. Utjecaj organskog otapala na aktivnost lipaze

Budući da odabrani supstrat pNP-palmitat nije topljiv u vodi, primjena i odabir odgovarajućeg organskog otapala za razvoj spektrofotometrijskog testa bila je nužna iz nekoliko razloga: (a)

organska otapala utječu na brzinu reakcije hidrolize (ne)mogućnošću otapanja supstrata u potrebnoj koncentraciji, (b) djeluju inhibicijski na enzim, (c) utječu na konformacijske promjene trodimenzionalne strukture aktivnog mjesta enzima te posljedično tomu mogu utjecati na formiranje enzim-supstrat kompleksa kao i na prijelazna stanja reakcije (Kamal i sur., 2013). U istraživanju kojega su proveli Gang i sur. (2011) zabilježeno je smanjenje enzimske aktivnosti lipaze tolerantne na organska otapala (BF-3 lipaza iz *Bacillus cereus*), kad se koncentracija organskog otapala povećala od 10% do 50% (v/v).

Iz navedenih razloga, u ovom istraživanju ispitan je utjecaj 8 organskih otapala u volumnom udjelu od 2% do 10% (v/v) na hidrolitičku aktivnost TLL. Prema dobivenim rezultatima (**Slika 17**) može se zaključiti da se reakcija hidrolize supstrata može provoditi u prisutnosti svih ispitanih organskih otapala, ali u različitom volumnom udjelu organskog otapala u reakcijskom mediju. Također, bitno je napomenuti da je tijekom pripreme reakcijske smjese došlo do agregacije supstrata u slučaju kad je korišteno manje od 3% (v/v) organskog otapala. Tijekom pregleda literature i postavljanja početnih reakcijskih uvjeta, izopropanol je odabran kao najčešće korišteno otapalo za *p*NP-palmitat. U ovom istraživanju, veća hidrolitička aktivnost TLL zabilježena je primjenom acetonitrila u udjelu od 4% (v/v) usporedno s izopropanolom. Slična zapažanja zabilježena su u drugim eksperimentima, osim u slučaju primjene metanola. Međutim, primjena metanola kao organskog otapala za supstrat je isključena iz daljnjeg istraživanja iz nekoliko razloga. Budući da u svojoj kemijskoj strukturi metanol ima hidroksilnu skupinu, kao takav može ujedno predstavljati i supstrat za lipazu u povratnoj reakciji esterifikacije s oslobođenom palmitinskom kiselinom iz *p*NP-palmitata. Nadalje, polarna organska otapala mogu djelovati inhibitorski na enzim vezanjem slobodne vode u okolini aktivnog mjesta enzima (Wang i sur., 2021), a poznato je da metanol ima veću relativnu polarnost (0,762) u usporedbi s acetonitriplom (0,460). Da bi se isključila i najmanja mogućnost povratne reakcije i kompeticije između hidrolize i esterifikacije, te moguća inhibicija enzima, u daljnjim koracima razvoja testa acetonitril je odabran kao organsko otapalo za supstrat i pripremu reakcijske smjese. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da TLL zadržava aktivnost i primjenom većeg udjela acetonitrila u reakcijskoj smjesi (od 5% do 8%). Daljnjim povećanjem koncentracije organskog otapala u reakcijskoj smjesi dolazi do aglomeracije molekula proteina i smanjenja aktivnosti lipaze. Nakon provedenih eksperimenata zaključeno je da je 4% acetonitrila u reakcijskoj smjesi neophodno za pripremu stabilne reakcijske smjese, uspostavljanje odgovarajuće međufazne površine između supstrata i enzima i isključenje mogućnosti inhibicije enzima.





**Slika 17.** Utjecaj organskih otapala na volumnu aktivnost lipaze

#### 4.1.5. Utjecaj emulgatora na aktivnost lipaze

Reakcija hidrolize *p*NP-palmitata katalizirana pomoću lipaze provodi se na granicama dviju faza: Organska faza sa supstratom i vodena faza s enzimom. Budući da je odabrani supstrat netopljiv u vodi, potrebno je provesti emulgiranje *p*NP-palmitata s ciljem pripreme stabilne reakcijske smjese. Primjenom emulgatora moguće je emulgiranje lipofilnog supstrata u vodi što rezultira olakšanim prijenosom mase na granici faza gdje se odvija reakcija hidrolize. Samim time, dolazi do povećanja hidrolitičke aktivnosti enzima. Određeni emulgatori utječu na aktivnost lipaze djelujući na hidrofobni polipeptidni lanac enzima koji se nalazi iznad aktivnog mjesta TLL te promjenom konformacije lipaze iz zatvorenog u otvoreni oblik mogu povećati hidrolitičku aktivnost enzima (De Rose i sur., 2017). Međutim, emulgatori mogu narušiti strukturu enzima te time dovesti do inhibicije. Iz navedenih razloga, ispitana je hidrolitička aktivnost TLL u prisutnosti različitih emulgatora u različitim koncentracijama.

U **Tablici 18** sažeti su rezultati provedenih eksperimenata u kojima je ispitan utjecaj emulgatora na aktivnost TLL. Najveća aktivnost TLL ( $r_1 = 222857$  U/cm<sup>3</sup>) zabilježena je primjenom emulgatora gume arabike u udjelu od 0,4% (w/v) u reakcijskoj smjesi (relativna aktivnost = 100%). Primjenom polimernih emulgatora (PEG 4000 i PEG 6000) došlo je do redukcije hidrolitičke aktivnosti TLL za 70%. U svim ostalim eksperimentima, dodatak emulgatora u reakcijsku smjesu rezultirao je 100%-tnom redukcijom hidrolitičke aktivnosti TLL.

U istraživanju koje su proveli Mesa i sur. (2018) ispitan je utjecaj pH reakcijskog medija na hidrolizu estera *p*NP-butirata pomoću TLL u prisutnosti neionskog surfaktanta Triton X-100. Maksimalna aktivnosti TLL zabilježena je pri pH 9 (što je u korelaciji s istraživanjem provedenim u ovom radu)

bez dodatka surfaktanta Triton X-100. U prisutnosti navedenog emulgatora, aktivnost TLL smanjila se za 80% pri pH 9, za razliku od eksperimenta koji je proveden pri pH vrijednosti 5 i u prisutnosti Triton X-100 gdje je zabilježena maksimalna aktivnost TLL. Nadalje, provedene su računalne simulacije koje su razjasnile korelacije između fizikalno-kemijskih promjena tijekom formiranja kompleksa enzima i površinski aktivne tvari pri različitim pH vrijednostima medija. Rezultati su pokazali da pH medija ima značajan utjecaj u formiranju kompleksa između proteina i surfaktanta, što u konačnici utječe na aktivnost i stabilnost TLL (Mesa i sur., 2018). Wang i sur. (2013) ispitali su stabilnost TLL pri različitoj pH vrijednosti medija u prisutnosti ionskog surfaktanta SDS-a. U pH rasponu od 2 do 7 i od 9 do 11, prisutnost SDS-a dovodi do deaktivacije TLL. Međutim, pri pH 8, TLL ostaje aktivan. Snižavanje pH vrijednosti reakcijskog medija dovodi do vezanja molekula ionskog surfaktanta za molekule enzima što dovodi do narušavanja prostorne strukture enzima, odnosno dolazi do denaturacije TLL. Također, smanjenje aktivnosti TLL u prisutnosti drugih testiranih emulgatora (poput Tween 20, Tween 40, Tween 80 i Span 80) zabilježeni su i u prethodno publiciranim istraživanjima (De Rose i sur., 2017). Rezultati navedenih istraživanja su u korelaciji s rezultatima dobivenim tijekom razvoja spektrofotometrijskog testa. U daljnjim ispitivanjima, za pripremu reakcijske smjese korištena je guma arabika kao emulgator u udjelu od 0,3% zato što nije zabilježena značajna razlika primjenom emulgatora u udjelu od 0,4%, dok povećanje udjela emulgatora u reakcijskoj smjesi utječe na viskozitet medija te samim time i na prijenos mase i aktivnost TLL.

**Tablica 18.** Utjecaj emulgatora na relativnu aktivnost lipaze

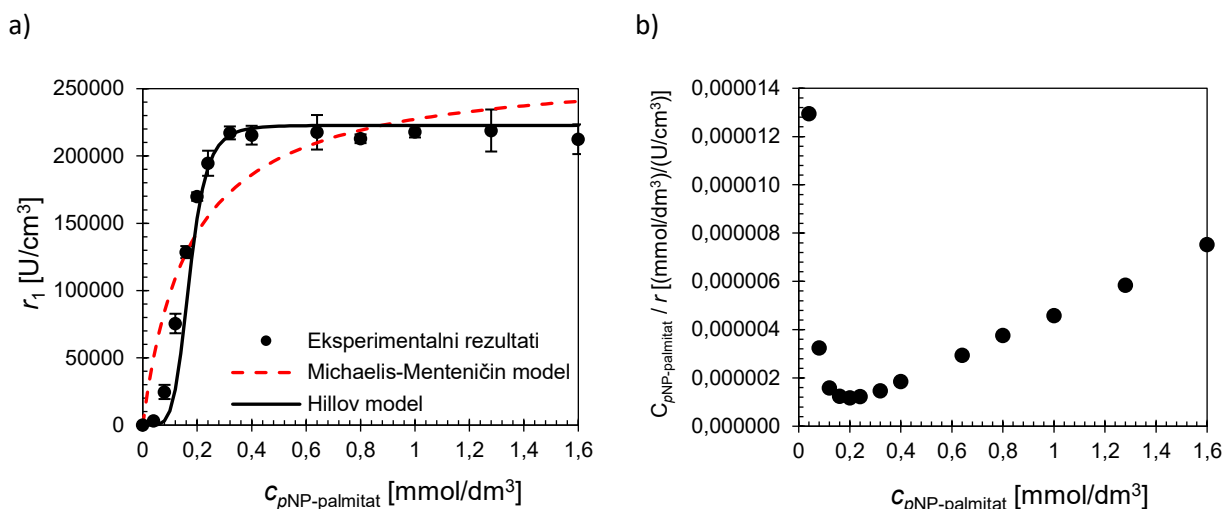
Emulgator	w [%] (w/v)	0,3	0,4	0,5
Guma arabika	TLL relativna aktivnost [%]	97	100	70
Emulgator	w [%] (w/v)	0,05	0,1	0,2
PEG 4000		34	33	27
PEG 6000		28	30	26
Triton X-45		0	0	0
Triton X-100		0	0	0
SDS	TLL relativna aktivnost [%]	0	0	0
CTAB		0	0	0
Tween 20		0	0	0
Tween 40		0	0	0
Tween 80		0	0	0
Span 80		0	0	0

#### 4.1.6. Procjena kinetičkih parametara hidrolize pNP-palmitata pomoću lipaze

Nakon definiranja optimalnih reakcijskih parametara, ispitana je ovisnost aktivnosti lipaze o koncentraciji supstrata. Eksperimentalni podatci aproksimirani su nelinearnom regresijom Michaelis-Menteničinog (formula (3)) i Hillovog kinetičkog modela (formula (4)).

Prema dobivenim rezultatima, vidljivo je da se enzimski katalizirana reakcija hidrolize pNP-palmitata u dvofaznom sustavu ne može opisati Michaelis-Menteničinim kinetičkim modelom (**Slika 18a**). Rezultati ukazuju na činjenicu da pri nižoj koncentraciji supstrata kinetika slijedi sigmoidnu krivulju. Dobiveni rezultati potvrđuju činjenicu da se lipaza u vodenom mediju nalazi u “zatvorenoj konformaciji” u kojoj se hidrofobni polipeptidni lanac nalazi iznad aktivnog mjesta enzima. U prisutnosti male koncentracije lipofilne molekule (poput pNP-palmitata), dolazi do konformacijske promjene iznad aktivnog mjesta lipaze te katalitička trijada postaje dostupna za stvaranje enzim-supstrat kompleksa čime započinje katalitički ciklus (Noro i sur., 2020). Nadalje, primjena Hanes-Woolfovog dijagrama (ovisnost količnika koncentracije supstrata i brzine reakcije o koncentraciji supstrata) omogućuje jednostavnu procjenu kinetičkih parametara linearizacijom eksperimentalnih podataka te je iz jednadžbe pravca ( $y = ax + b$ ) moguće odrediti  $V_m$  ( $1/a$ ) i  $K_m$  ( $b/a$ ). Budući da eksperimentalne rezultate nije bilo moguće aproksimirati jednadžbom pravca (**Slika 18b**), potvrđeno je odstupanje od Michaelis-Menteničine kinetike za promatranu reakciju.

Navedeno odstupanje od klasične Michaelis-Menteničine kinetike opisano je u radu autora Marangoni (1994). Ključni korak koji ograničava brzinu reakcije hidrolize jeste kooperativni proces u kojem dolazi do vezanja molekule lipaze za supstrat na granicama dviju faza čime dolazi do spomenute konformacijske promjene strukture enzima. Hillova konstanta  $n$  (formula (4)) predstavlja broj molekula supstrata povezanih s lipazom po katalitičkom ciklusu te se odnosi na indeks kooperativnosti procesa. U slučaju kada je  $n > 1$ , javlja se pozitivno kooperativno vezanje; za  $n < 1$  uočava se negativno kooperativno vezanje, a ako je  $n = 1$  vezanje je nekooperativno (potpuno neovisno – Michaelis-Menteničin model). Na temelju ove pretpostavke, eksperimentalni podatci aproksimirani su primjenom Hillovog modela, te je vidljivo bolje slaganje usporedno s Michaelis-Menteničinim modelom (**Slika 18a**). Nadalje, procijenjeni su kinetički parametri te su dobiveni rezultati prikazani u **Tablici 19**. Hillov koeficijent, određen za eksperimente provedene pri početnim reakcijskim uvjetima te nakon provedene optimizacije reakcijskih uvjeta, ukazuje na kooperativno vezanje enzima i supstrata. Također, Hillov koeficijent određen nakon optimizacije je veći 2,30 puta, što ukazuje da je optimizacijom reakcijskih uvjeta poboljšani navedeni kooperativni proces. Zaključno, aktivnost TLL bila je veća za 1,49 puta nakon provedene optimizacije reakcijskih uvjeta hidrolize pNP-palmitata.



**Slika 18. a)** Ovisnost volumne aktivnosti lipaze o koncentraciji supstrata (otopine supstrata pripremljene u acetonitrilu; volumni udio organskog otapala u reakcijskoj smjesi 4%; maseni udio gume arabike u reakcijskoj smjesi 0,3%; TRIS-HCl pufer pH = 9); **b)** Hanes-Woolfov dijagram

Za dodatnu potvrdu prikladnosti Hillovog modela, primijenjen je kriterij odabira modela (MSC), ugrađen u Scientist, koji je pokazao bolje slaganje eksperimentalnih podataka s Hillovim modelom (**Tablica 19**). Također, prema rezultatima prikazanim u **Tablici 19**, može se zaključiti da TLL pokazuje veliki afinitet prema *p*NP-palmitatu kao supstratu ( $K_m = 0,173 \text{ mmol/dm}^3$ ) što je u skladu s literaturnim podacima ( $K_{m,app} = 0,183 \text{ mmol/dm}^3$ ) (Palacios i sur., 2014).

**Tablica 19.** Kinetički parametri procijenjeni za Michaelis-Menteničin i Hillov model prije i nakon optimizacije reakcijskih uvjeta hidrolize *p*NP-palmitata pomoću lipaze

	Početni reakcijski uvjeti (Slika 16)			Optimirani uvjeti testa (Slika 18)		
	Michaelis-Menteničina kinetika	Hillova kinetika	kriterij odabira modela	Michaelis-Menteničina kinetika	Hillova kinetika	kriterij odabira modela
$K_m$ [mmol/dm <sup>3</sup> ]	0,264 ±0,066	0,250 ± 0,02	Michaelis-Menteničin model: 2,11  Hillov model: 2,45	0,173 ± 0,058	0,173 ± 0,010	Michaelis-Menteničin model: 1,41  Hillov model: 2,19
$V_m$ [U/cm <sup>3</sup> ]	174629 ± 13868	149028 ± 7727		266593 ± 26285	222781 ± 9112	
$n$ (-)	-	2,38 ± 0,546		-	5,48 ± 1,55	

## 4.2. OPTIMIZACIJA PROCESNIH UVJETA PROIZVODNJE LIPAZE VISOKE VOLUMNE AKTIVNOSTI

### 4.2.1. Rezultati proizvodnje lipaze prema procesnim uvjetima definiranim u eksperimentalnoj matrici

U prvom djelu optimizacije proizvodnje lipaze ispitan je utjecaj 5 nezavisnih varijabli u 3 razine (početna masa supstrata ( $X_1$ ), udio inokuluma ( $X_2$ ), udio vlage ( $X_3$ ), vrijeme fermentacije ( $X_4$ ), temperatura fermentacije ( $X_5$ )) na proizvodnju lipaze ( $Y$ ). U tu svrhu, definirana je eksperimentalna matrica prema Box-Behnkenovom dizajnu prema kojemu je provedeno 46 eksperimenata sa 6 ponavljanja u centralnoj točki ispitnog područja. Rezultati mjerenja volumne aktivnosti lipaze prikazani su u **Tablici 20**. Prema dobivenim rezultatima zaključeno je da procesni uvjeti definirani u ispitnom području značajno utječu na proizvodnju lipaze. Navedena tvrdnja proizlazi iz dobivenih eksperimentalnih rezultata volumne aktivnosti lipaze koji su bili u rasponu od 0,0085 U/cm<sup>3</sup> do 16,5096 U/cm<sup>3</sup>.

**Tablica 20.** Srednje vrijednosti volumne aktivnosti lipaze u ekstraktima biološki obrađene bučine pogače dobivenim pri ispitivanju različitih procesnih uvjeta fermentacije prema Box-Behnkenovom dizajnu (eksperimentalna matrica)

broj eksperimenta	$X_1$ [g]	$X_2$ [-]	$X_3$ [%]	$X_4$ [dani]	$X_5$ [°C]	$Y$ [U/cm <sup>3</sup> ]
1	30	3	60	3	40	1,8716
2	70	3	60	3	40	0,6617
3	30	7	60	3	40	2,4867
4	70	7	60	3	40	0,1467
5	50	5	50	2	40	1,4402
6	50	5	70	2	40	0,0109
7	50	5	50	4	40	4,1764
8	50	5	70	4	40	0,0537
9	50	3	60	3	35	0,0181
10	50	7	60	3	35	0,0194
11	50	3	60	3	45	16,2229
12	50	7	60	3	45	16,0079
13	30	5	50	3	40	9,9086
14	70	5	50	3	40	1,1626
15	30	5	70	3	40	0,0837



16	70	5	70	3	40	<b>0,0085</b>
17	50	5	60	2	35	<b>0,0103</b>
18	50	5	60	4	35	<b>0,0103</b>
19	50	5	60	2	45	<b>16,1751</b>
20	50	5	60	4	45	<b>2,1193</b>
21*	50	5	60	3	40	<b>1,5056</b>
22*	50	5	60	3	40	<b>1,5138</b>
23*	50	5	60	3	40	<b>1,6209</b>
24	50	3	50	3	40	<b>0,2787</b>
25	50	7	50	3	40	<b>4,4765</b>
26	50	3	70	3	40	<b>0,0486</b>
27	50	7	70	3	40	<b>0,3144</b>
28	30	5	60	2	40	<b>0,4377</b>
29	70	5	60	2	40	<b>0,3937</b>
30	30	5	60	4	40	<b>3,0229</b>
31	70	5	60	4	40	<b>0,8553</b>
32	50	5	50	3	35	<b>0,0194</b>
33	50	5	70	3	35	<b>0,0195</b>
34	50	5	50	3	45	<b>13,2841</b>
35	50	5	70	3	45	<b>14,2637</b>
36	30	5	60	3	35	<b>0,0175</b>
37	70	5	60	3	35	<b>0,0121</b>
38	30	5	60	3	45	<b>10,9188</b>
39	70	5	60	3	45	<b>16,5096</b>
40	50	3	60	2	40	<b>2,7065</b>
41	50	7	60	2	40	<b>3,5862</b>
42	50	3	60	4	40	<b>1,6495</b>
43	50	7	60	4	40	<b>2,0022</b>
44*	50	5	60	3	40	<b>1,7355</b>
45*	50	5	60	3	40	<b>1,3991</b>
46*	50	5	60	3	40	<b>1,8770</b>

\*centralne točke ispitnog područja

#### 4.2.2. Modeliranje i statistička optimizacija procesnih uvjeta proizvodnje lipaze

Za procjenu utjecaja nezavisnih varijabli na proizvodnju lipaze, provedena je aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom, evaluacija prikladnosti modela matematičko-statističkim metodama, statistička analiza utjecaja faktora modela te numerička optimizacija nezavisnih varijabli pomoću programskog paketa Design-Expert® 7.0.0 s ciljem definiranja optimalnih uvjeta proizvodnje lipaze. Stoga je provedena analiza varijance kako bi se utvrdilo koji od modela (linearni, dvofaktorijalni, kvadratni i kubični model) najbolje opisuje dobivene eksperimentalne podatke. Prema kriteriju  $p < 0,05$  za ocjenu nezavisnih varijabli, odabran je kvadratni polinom (formula (51)):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_1^2 X_1^2 + \beta_2^2 X_2^2 + \beta_3^2 X_3^2 + \beta_4^2 X_4^2 + \beta_5^2 X_5^2 + \beta_1 \beta_2 X_1 X_2 + \beta_1 \beta_3 X_1 X_3 + \beta_1 \beta_4 X_1 X_4 + \beta_1 \beta_5 X_1 X_5 + \beta_2 \beta_3 X_2 X_3 + \beta_2 \beta_4 X_2 X_4 + \beta_2 \beta_5 X_2 X_5 + \beta_3 \beta_4 X_3 X_4 + \beta_3 \beta_5 X_3 X_5 + \beta_4 \beta_5 X_4 X_5 \quad (51)$$

Budući da se odabrani model, s obzirom na broj promatranih varijabli koje utječu na odaziv, sastoji od 5 linearnih članova, 5 kvadratnih članova i 10 interakcijskih članova, provedena je statistička analiza članova modela (ANOVA). Članovi modela koji su imali najmanji statistički značajan utjecaj na promatrani odgovor procesa isključeni su iz modela, eksperimentalni podaci su ponovno aproksimirani dobivenim reduciranim modelom te je provedena statistička analiza članova reduciranog modela. Proces se ponavljao sve dok nisu ostali samo oni članovi modela koji su imali statistički značajan utjecaj na promatrani proces (engl. “*backward elimination approach*”). ANOVA analiza (**Tablica 21**) dobivenog reduciranog matematičkog modela s pripadajućim koeficijentima regresije (formula (52)) pokazali su da je model statistički značajan za optimizaciju proizvodnje lipaze.

$$Y = 1,68 + (-1,10 \cdot X_1) + 1,03 \cdot X_2 + (-1,82 \cdot X_3) + 4,48 \cdot X_5 + 2,82 \cdot X_5^2 + 2,17 \cdot X_1 \cdot X_3 + 2,68 \cdot X_2 \cdot X_5 + (-2,04 \cdot X_3 \cdot X_5) + (-2,29 \cdot X_4 \cdot X_5) \quad (52)$$

Za provjeru značajnosti svake od testiranih nezavisnih varijabli i njihove interakcije na odaziv korištene su  $p$ -vrijednosti. Sukladno tomu, temperatura ( $X_5$ ) je imala najveći utjecaj na proizvodnju lipaze, zatim udio vlage ( $X_3$ ), početna masa supstrata ( $X_1$ ) te udio inokuluma ( $X_2$ ). Nezavisna varijabla  $X_4$  (vrijeme fermentacije) uklonjena je iz modela kao linearni član. Međutim, kao član interakcije s temperaturom ( $X_4 X_5$ ) vrijeme kao nezavisna varijabla pokazuje statistički značajan utjecaj na proizvodnju lipaze. Signifikantnost u modelu također predstavlja i međusobna interakcija temperature i udjela inokuluma ( $X_2 X_5$ ) te temperature i udjela vlage ( $X_3 X_5$ ).

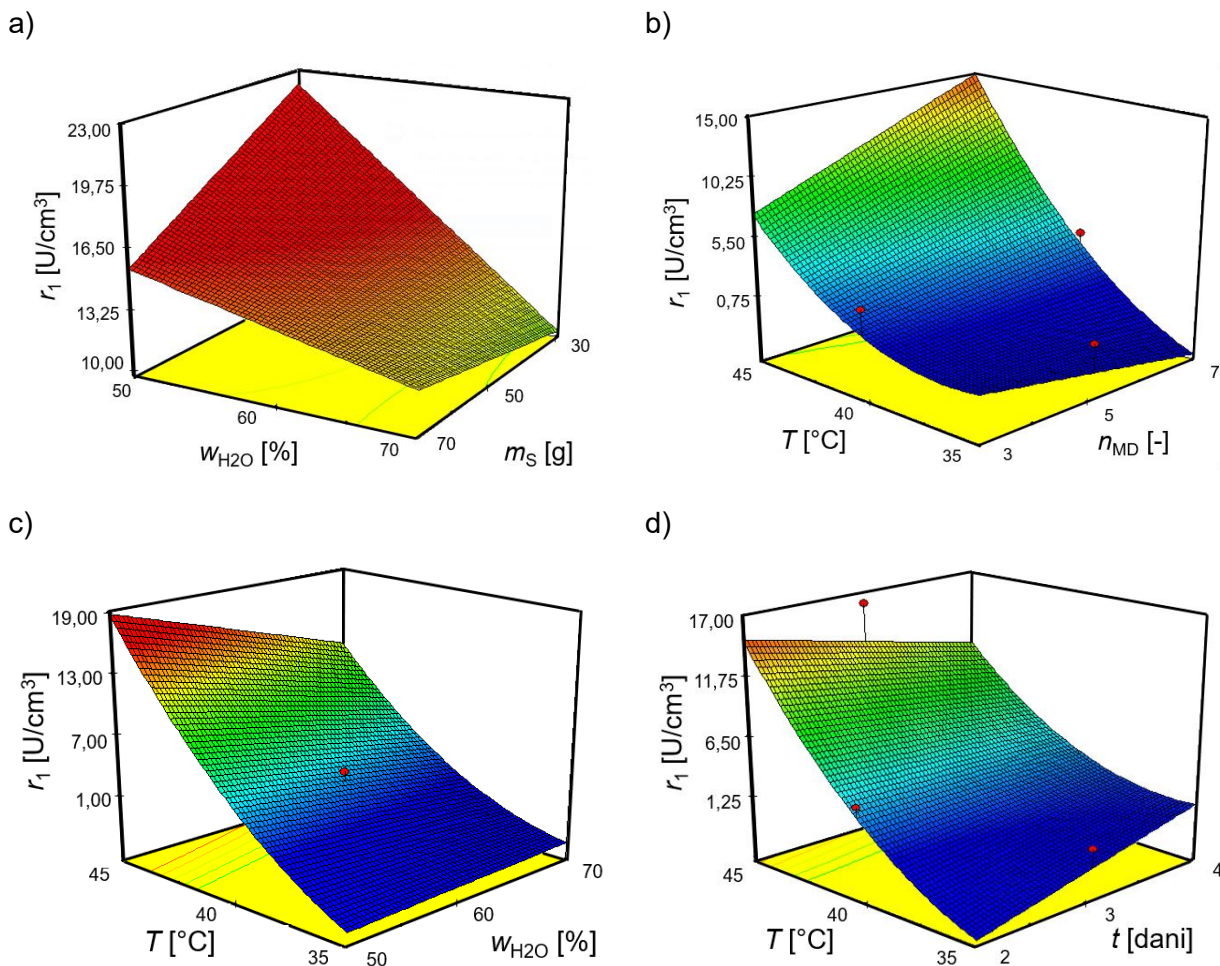
"F-vrijednost" modela je 17,44 i izračunava se kao omjer kvadrata regresije modela ( $MS = 50,72$ ) i kvadrata ostatka (2,96) te implicira da je model značajan sa samo 0,01% šanse da bi se "F-vrijednost" modela mogla pojaviti zbog "šuma modela". Vrlo niska "P-vrijednost modela" ( $< 0,0001$ ) i  $R^2 = 0,8282$  implicira da predloženi reducirani kvadratni model dobro opisuje odnos između promatranog odziva procesa (proizvodnje lipaze) i utjecaja značajnih neovisnih varijabli te ovaj model može objasniti 82,82% varijabilnosti u odazivu. Predloženi matematički model primijenjen je u numeričkoj optimizaciji optimalnih parametara za proizvodnju lipaze.

**Tablica 21.** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno određene aktivnosti lipaze u ekstraktima biološki obrađene bučine pogače polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	456,51	9	50,72	17,14	< 0,0001
<i>Linearni članovi</i>					
$X_1$	17,76	1	17,76	6,00	0,0200
$X_2$	14,99	1	14,99	5,07	0,0314
$X_3$	46,35	1	46,35	15,66	0,0004
$X_5$	162,02	1	162,02	54,75	< 0,0001
<i>Kvadratni član</i>					
$X_5^2$	50,48	1	50,48	17,06	0,0002
<i>Članovi interakcije</i>					
$X_1X_3$	18,80	1	18,80	6,35	0,0169
$X_2X_5$	18,48	1	18,48	6,25	0,0178
$X_3X_5$	10,65	1	10,65	3,60	0,0668
$X_4X_5$	13,98	1	13,98	4,73	0,0372
Ostatak	94,69	32	2,96		
Nedostatak modela	93,50	27	3,46	14,54	0,0036
Pogreška	1,19	5	0,24		
Ukupno	551,20	41			
$R^2$	0,8282				

SS = suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df = stupnjevi slobode; MS = varijanca

Vizualni prikaz međusobnog utjecaja statistički značajnih članova na promatrani odziv (aktivnost lipaze) prikazani su trodimenzionalnim (3D) odzivnim površinama konstruiranih pomoću definiranog matematičkog modela (**Slika 19 a – d**).

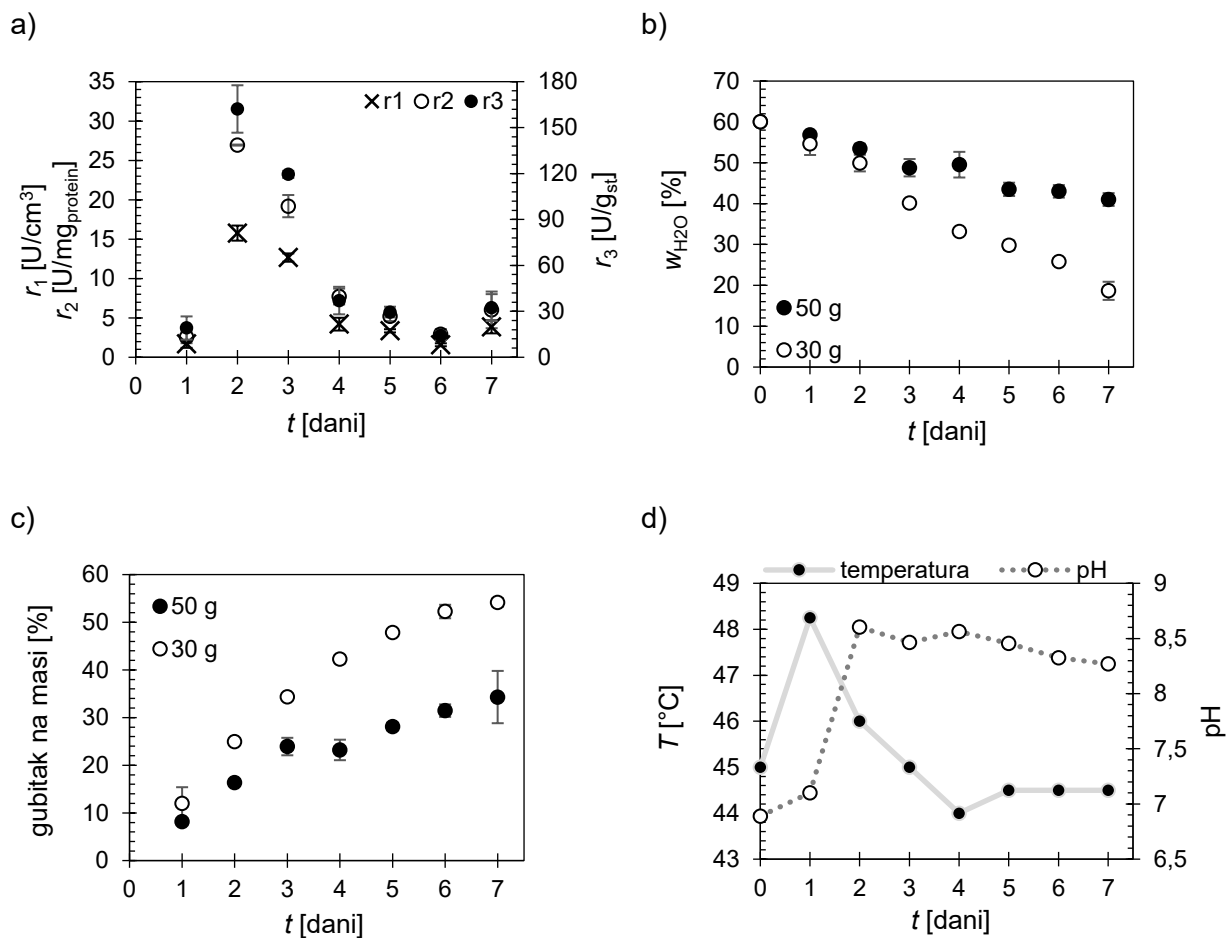


**Slika 19.** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za proizvodnju TLL dobiven numeričkom optimizacijom kao funkcija statistički značajnih varijabli interakcije: a) udjela vode i mase supstrata; b) temperature i udjela inokuluma; c) temperature i udjela vode; d) temperature i vremena fermentacije

Reducirani matematički model (formula (52)) korišten je za numeričku optimizaciju procesnih uvjeta fermentacije s ciljem proizvodnje lipaze maksimalne aktivnosti. Definirani optimalni uvjeti su:  $m_s = 50$  g,  $n_{MD} = 7$ ,  $w_{H_2O} = 60\%$ ,  $t = 2$  dana,  $T = 45$  °C. Prema predikciji matematičkog modela i primjenom definiranih uvjeta fermentacija, maksimalna aktivnost lipaze iznosila bi 14,9985 U/cm<sup>3</sup>. Sukladno navedenom, provedena je validacija prema definiranim optimalnim uvjetima te

je izmjerena aktivnost lipaze od  $15,7690 \text{ U/cm}^3$  što pokazuje kako je model sa 95,113% točnosti pokazao podudaranje s eksperimentalnim rezultatom.

Nakon optimizacije procesnih uvjeta proizvodnje lipaze, proveden je SSF proces prema definiranim optimalnim uvjetima u trajanju od 7 dana. Tijekom fermentacije praćena je aktivnost lipaze, udio vlage supstrata (tj. suhe tvari), gubitak mase supstrata, pH i promjena temperature tijekom SSF procesa. Aktivnost lipaze prikazana je kao volumna aktivnost  $r_1 [\text{U/cm}^3]$ , specifična aktivnost  $r_2 [\text{U/mg}_{\text{protein}}]$  te aktivnost lipaze izražena prema masi suhe tvari biološki obrađenog supstrata  $r_3 [\text{U/g}_{\text{st}}]$ . Dobiveni rezultati prikazani su na **Slici 20 a-d** i opisani u sljedećim poglavljima.



**Slika 20.** a) Profil proizvodnje lipaze tijekom uzgoja *T. lanuginosus* tijekom 7 dana SSF primjenom optimiziranih procesnih uvjeta; b) Utjecaj početne mase supstrata na udio vlage tijekom SSF; c) Utjecaj početne mase supstrata na ukupni gubitak mase tijekom SSF; d) Promjena temperature i pH vrijednosti supstrata tijekom proizvodnje lipaze

#### 4.2.2.1. Utjecaj vremena fermentacije na proizvodnju lipaze

Prema rezultatima prikazanim na **Slici 20a**, maksimalna aktivnost lipaze postignuta je nakon drugog dana SSF procesa nakon čega je uslijedila redukcija aktivnosti TLL. Prikazani rezultati aktivnosti lipaze su u korelaciji s dobivenim reduciranim modelom (formula (52)) u kojemu je sadržan negativni predznak prije parametra interakcije koji sadrži varijablu  $X_4$  (vrijeme fermentacije). Trend smanjenja aktivnosti lipaze tijekom vremena fermentacije vidljiv je i pomoću 3D odzivne površine (**Slika 19d**). Najveća volumna aktivnost iznosila je  $15,77 \text{ U/cm}^3$ , specifična aktivnost  $26,94 \text{ U/mg}_{\text{protein}}$ , te  $162,15 \text{ U/g}_{\text{st}}$  izraženo na suhu tvar supstrata. Smanjenje aktivnosti lipaze tijekom SSF procesa može biti povezana s promjenom udjela vlage supstrata, promjene u pH vrijednosti, te smanjenjem koncentracije potrebitih izvora ugljika poput ulja koji djeluju inducibilno u proizvodnji lipaze. Također, na represiju proizvodnje lipaze ili čak inhibiciju mogu utjecati polifenolni spojevi koji se prirodno pojavljuju u supstratu ili su enzimatski otpušteni tijekom fermentacije, kao i zbog izlučivanja sekundarnih metabolita radnog mikroorganizma (Yang i sur., 2020). Sličan trend u aktivnosti tijekom proizvodnje lipaze zabilježili su mnogi autori, dok se djelovanje enzima proteaza smatrala glavnim razlogom inhibicije lipaze (Di Luccio i sur., 2004; Kempka i sur., 2008). S obzirom na navedene rezultate, dodatni eksperimenti, u kojima bi se trebala mjeriti aktivnost enzima proteaza, te utjecaj modelnih otopina polifenolnih spojeva i drugih sekundarnih metabolita na aktivnost lipaze, ključni su za potporu navedene hipoteze.

#### 4.2.2.2. Utjecaj početne mase supstrata i početne vlažnosti supstrata na proizvodnju lipaze

Početa masa supstrata i početni udio vlage supstrata pokazale su se kao statistički značajne varijable u proizvodnji lipaze tijekom SSF procesa (**Tablica 21**). U predloženom modelu (formula (52)), negativni predznak koji se nalazi ispred varijable  $X_1$  (početna masa supstrata) ukazuje da bi povećanje početne mase supstrata rezultiralo redukcijom u proizvodnji lipaze. Također, utjecaj varijable  $X_1$  u interakciji s drugim varijablama na proces proizvodnje lipaze prikazan je vizualno pomoću 3D odzivnih površina (**Slika 19a**), iz čega se također može zaključiti da povećanje početne mase supstrata rezultira smanjenom proizvodnjom lipaze. Navedeno se može objasniti činjenicom da veća početna masa supstrata rezultira i većom visinom sloja u laboratorijskom bioreaktoru (laboratorijska staklenka) u kojoj je provedena fermentacija, a samim time otežana je izmjena tvari, plinova i energije tijekom SSF. Uzevši u obzir interakcije s drugim nezavisnim varijablama, provedena je matematička optimizacija i definirana je optimalna početna masa supstrata od 50 g. Budući da je predloženi matematički model favorizirao smanjenje početne mase supstrata s ciljem maksimalne proizvodnje lipaze, provedena je fermentacija s početnom masom

supstrata od 30 g. Prema dobivenim rezultatima (**Slika 20b** i **Slika 20c**) može se zaključiti da smanjenje početne mase supstrata rezultira većom stopom smanjenja udjela vlage supstrata kao i gubitka mase supstrata. Navedeno je rezultiralo bržim isušivanjem supstrata i smanjenom proizvodnjom lipaze. U isto vrijeme, povećanje početnog udjela vlage rezultiralo je smanjenom proizvodnjom lipaze tijekom SSF procesa (potvrđeno negativnim predznakom ispred parametra  $X_3$ , sadržaj vlage). Vizualnim opažanjem zaključeno je da veći udio vlage uzrokuje aglomeraciju ili lijepljenje čestica supstrata, što negativno utječe na proces fermentacije. Uzimajući u obzir dobivene rezultate, početni udio vlage supstrata od 60% i početna masa supstrata od 50 g bili su optimalni za SSF što je potvrđeno RSM analizom i validacijom predloženog modela.

#### 4.2.2.3. Utjecaj temperature na proizvodnju lipaze

ANOVA analiza utjecaja nezavisnih varijabli na SSF proces pokazala je da varijabla  $X_5$  (temperatura) ima najveći utjecaj na proizvodnju lipaze. Prema predloženom modelu (formula (52)) pozitivan predznak ispred varijable  $X_5$  implicira da povećanje temperature tijekom SSF rezultira povećanjem aktivnosti lipaze. Navedeni rezultati su u skladu s karakteristikama gljive *T. lanuginosus*, budući da povećanje temperature pozitivno utječe na rast i metaboličku aktivnost termofilnog mikroorganizma. Da bi se vizualizirao međusobni utjecaj interakcije promatrane varijable temperature i drugih statistički značajnih varijabli, konstruirane su 3D odzivne površine (**Slike 19 b-d**).

Kao što je predviđeno matematičkim modelom (formula (52)) viša temperatura rezultirala bi većom proizvodnjom lipaze. Međutim, treba istaknuti tehnološke zahtjeve za regulacijom temperature tijekom SSF procesa koji se provodi u bioreaktoru bez miješanja. Tijekom fermentacije može doći do povećanja temperature u sloju supstrata zbog metaboličke aktivnosti radnog mikroorganizma, smanjenog udjela vode i niske toplinske vodljivosti supstrata (Figueroa-Montero i sur., 2011; Vauris i sur., 2022). Akumulacija topline kao i ograničenje miješanja supstrata moglo bi dovesti do porasta temperature iznad optimalnih vrijednosti za rast mikroorganizma i proizvodnju enzima. Iz tih razloga, temperaturu zraka u bioreaktoru treba održavati blizu optimalne temperature za rast mikroorganizama. Iz navedenih razloga, u ovom istraživanju provedeno je mjerenje temperature u sloju supstrata. Prema rezultatima (**Slika 20d**) vidljiv je nagli porast temperature s 45 °C na 48,25 °C u sloju supstrata tijekom 24 sata fermentacije zbog akumulacije topline izazvane metaboličkom aktivnošću mikroorganizma, što bi mogao biti ključni razlog intenzivne proizvodnje lipaze unutar prva dva dana SSF procesa.

#### 4.2.2.4. Promjena pH vrijednosti supstrata tijekom fermentacije

Osim ispitanih procesnih parametara u ovom radu, proizvodnja metabolita i tijek SSF procesa pod utjecajem je pH medija (Kumar i Ray, 2014). U ovom radu, praćena je promjena pH supstrata tijekom fermentacije (**Slika 20d**). pH vrijednost biološki neobrađenog i nesteriliziranog supstrata bila je 6,89. Porast pH vrijednosti uočen je između prvog i drugog dana fermentacije do pH vrijednosti 8,60. U nastavku fermentacije, zabilježeno je blago smanjenje pH vrijednost do 8,27. Povećanje pH vrijednosti i smanjenje aktivnosti lipaze nakon drugog dana fermentacije može se objasniti proteolitičkom aktivnošću i oslobađanjem amonijevih iona tijekom deaminacije aminokiselina (Di Luccio i sur., 2004).

#### **4.2.3. Pročišćavanje lipaze kromatografijom i elektroforeza lipaze**

Pripremljeni ekstrakt lipaze je pročišćen kolonskom kromatografijom i Sephadexom G-100 kao stacionarnom fazom. U prvom koraku, ekstrakt lipaze koncentriran je vakuum uparivanjem kako bi se povećala koncentracija TLL u ekstraktu i dobio dobar vizualni odgovor na gelu korištenom u postupku elektroforeze. Koncentriranje ekstrakta vakuum uparivanjem rezultiralo je povećanjem volumne aktivnosti lipaze s 10,87 U/cm<sup>3</sup> na 75,64 U/cm<sup>3</sup>, te povećanjem masene koncentracije proteina s 2,19 mg/cm<sup>3</sup> na 5,27 mg/cm<sup>3</sup> (**Tablica 22**). Nakon pročišćavanja kromatografijom, volumna aktivnost lipaze nije značajno povećana u odnosu na početnu aktivnost lipaze te je iznosila 12,34 U/cm<sup>3</sup>. Međutim, tijekom pročišćavanja došlo je do uklanjanja drugih kontaminirajućih proteina. Navedeno je vidljivo iz rezultata mjerenja masene koncentracije proteina. Nakon kromatografskog frakcioniranja, masena koncentracija proteina u frakciji s najvećom volumnom aktivnosti lipaze iznosila je 0,46 mg/cm<sup>3</sup>. Odnosno, ukupni proteini u ekstraktu lipaze prije pročišćavanja iznosili su 218,70 mg, dok je nakon pročišćavanja masa ukupnih proteina bila 0,23 mg. Samim time, specifična aktivnost lipaze je povećana s 4,97 U/mg<sub>protein</sub> na 26,95 U/mg<sub>protein</sub>, odnosno, stupanj pročišćavanja primjenom kolonske kromatografije iznosio je 5,42.

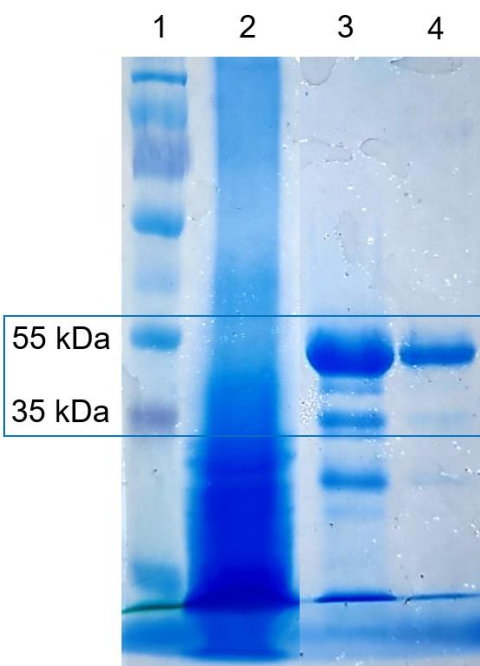


**Tablica 22.** Rezultati pročišćavanja lipaze kromatografijom

Uzorak	V [cm <sup>3</sup> ]	Ukupna aktivnost [U]	Ukupni proteini [mg]	$r_1$ [U/cm <sup>3</sup> ]	$\gamma_{\text{protein}}$ [mg/cm <sup>3</sup> ]	$r_2$ [U/mg protein]	F [-]	Prinos [%]
Nepročišćeni ekstrakt	100	1087	218,70	10,87	2,19	4,97	1,00	100,00
Upareni ekstrakt	7,10	537,04	37,42	75,64	5,27	14,35	2,8	49,41
Pročišćeni ekstrakt	0,5	6,17	0,23	12,34	0,46	26,95	5,42	0,57

Nakon kromatografije, pročišćeni uzorak podvrgnut je elektroforezi u poliakrilamidnom gelu u svrhu procjene molekulske mase lipaze usporedbom s proteinskim markerima. Ujedno je provedena i usporedba dobivenih rezultata proizvedene lipaze s komercijalnom lipazom (**Slika 21**). Na temelju vizualne percepcije dobivenih rezultata, utvrđeno je da koncentrirani sirovi ekstrakt (**Slika 21**, linija 2) sadrži veliku količinu kontaminirajućih proteina, što je u skladu s rezultatima prikazanim u **Tablici 22**. Dobiveni rezultati elektroforeze daju uvid u dodatne informacije o veličini kontaminirajućih proteina, iz čega se može zaključiti da se radi o proteinima molekulske mase manje od 35 kDa. Usporedbom rezultata dobivenih za komercijalnu i proizvedenu TLL, može se zaključiti da se vrpce iz linije 3 i linije 4 poklapaju čime je dokazano da se radi o proteinskoj molekuli lipaze. Nadalje, iz rezultata za linije 3 i 4 vidljivo je da se po dvije vrpce pojavljuju na istim mjestima. Kao što je ranije opisano (poglavlje 4.1.1.), TLL se u vodenom mediju javlja u obliku monomerna i dimera što bi moglo objasniti detekciju dviju vrpce, kako u uzorku s komercijalnom TLL, tako i u uzorku s proizvedenom i pročišćenom TLL. Slični rezultati istraživanja su već objavljeni u kojima je elektroforeza lipaze također pokazala dvije glavne vrpce, jedna oko 50 kDa, a druga između 25 i 37 kDa (Gonçalves i sur., 2014).

Osim detekcije i potvrđivanja molekulske mase TLL, vizualno promatranje dobivenog poliakrilamidnog gela jasno pokazuje da se vrlo čisti enzimski pripravak može dobiti korištenjem kolonske kromatografije budući da nakon pročišćavanja nisu zabilježene vrpce u području molekulske mase manje od 35 kDa (kao što je to u slučaju s nepročišćenom lipazom). Dobiveni rezultati su u skladu s masenom koncentracijom proteina izmjerenom nakon pročišćavanja i visokim faktorom pročišćavanja. Međutim, prinos kromatografske metode pročišćavanja lipaze je nizak (0,57%) te je iz tog razloga navedena metoda pročišćavanja TLL isključena iz daljnjih istraživanja.

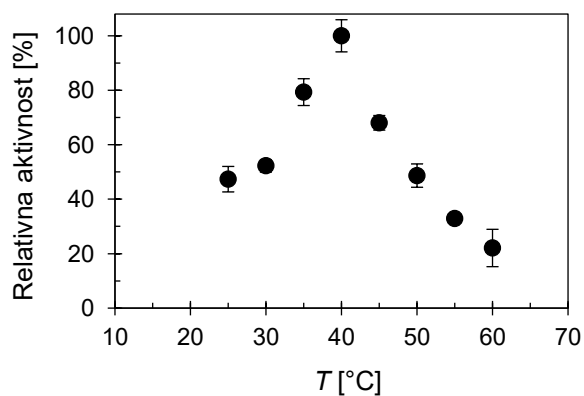


**Slika 21.** Linija 1 - markeri proteina (PageRuler™ Prestained Protein Ladder); Linija 2 - nepročišćeni koncentrirani ekstrakt lipaze; Linija 3 - standard komercijalne lipaze (Lipolase 100L); Linija 4 - pročišćeni ekstrakt lipaze

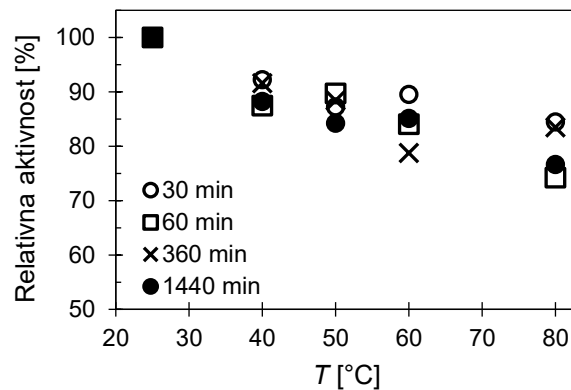
#### 4.2.4. Karakterizacija nepročišćene lipaze

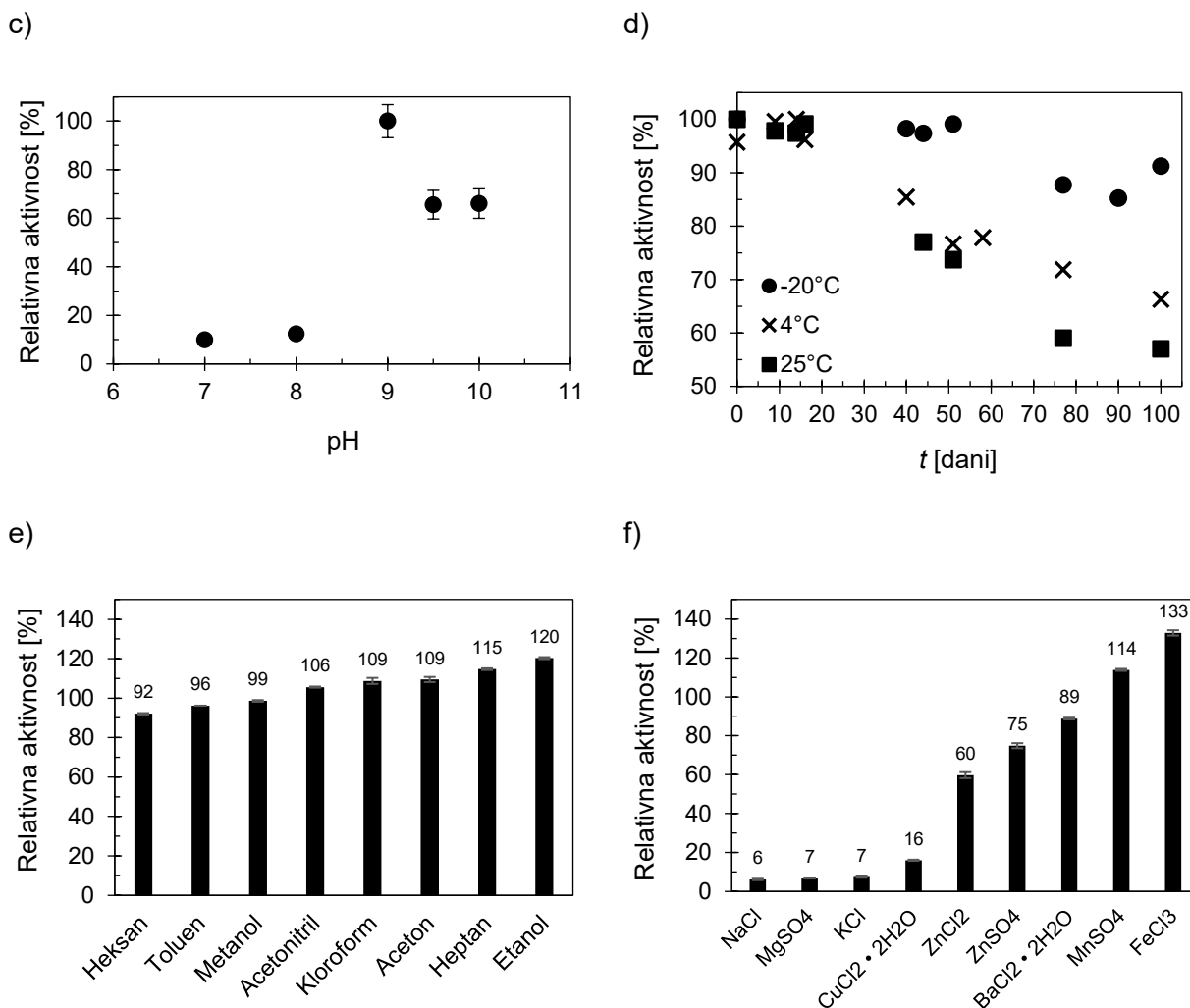
Nepročišćeni enzimski ekstrakt lipaze dobiven ekstrakcijom biološki obrađene bučine pogače nakon optimizacije uvjeta SSF procesa korišten je za biokemijsku karakterizaciju enzima. Rezultati istraživanja prikazani su grafički (**Slika 22 a – f**), a hidrolitička aktivnost TLL je izražena kao relativna aktivnost.

a)



b)





**Slika 22.** Karakterizacija nepročišćene lipaze: a) ovisnost aktivnosti lipaze o temperaturi; b) termostabilnost lipaze; c) ovisnost aktivnosti lipaze o pH reakcijskog medija; d) utjecaj uvjeta skladištenja na aktivnost lipaze; e) utjecaj organskog otapala na aktivnost lipaze; f) utjecaj iona metala na aktivnost lipaze

#### 4.2.4.1. Ovisnost aktivnosti lipaze o temperaturi

Istraživanje utjecaja temperature na aktivnost lipaze provedeno je u temperaturnom rasponu od 25 °C do 60 °C. Prema rezultatima (**Slika 22a**), nepročišćena TLL pokazuje maksimalnu hidrolitičku aktivnost prema *p*NP-palmitatu pri temperaturi od 40 °C. Također, prema rezultatima vidljivo je da povećanjem ili sniženjem temperature za 5 °C u odnosu na temperaturu na kojoj TLL pokazuje maksimalnu aktivnost, dolazi do redukcije hidrolitičke aktivnosti lipaze za 20 – 30%. Dobiveni eksperimentalni rezultati u skladu su s publiciranim rezultatima mjerenja ovisnosti aktivnosti TLL o temperaturi (Tišma i sur., 2019).

#### 4.2.4.2. Stabilnost lipaze tijekom inkubacije pri povišenoj temperaturi

Prema rezultatima dobivenim u prethodnom poglavlju, vidljivo je da povećanje temperature reakcijskog medija iznad 40 °C rezultira redukcijom hidrolitičke aktivnosti TLL prema odabranom supstratu. Kako bi se ispitala stabilnost nepročišćene lipaze pri povišenoj temperaturi, provedena je inkubacija lipaze u temperaturnom rasponu od 25 °C do 80 °C. Na temelju rezultata (**Slika 22b**) zabilježena je redukcija hidrolitičke aktivnosti TLL za 20% početne aktivnosti u testiranom temperaturnom rasponu. Budući da je lipaza zadržala aktivnost nakon inkubacije na 80 °C u trajanju od 24 sata, zaključeno je da povećana temperatura ne dovodi do inhibicije lipaze termičkom denaturacijom nego dolazi do redukcije hidrolitičke aktivnosti prema testiranom supstratu *p*NP-palmitatu pri temperaturi većoj od 40 °C. Na temelju dobivenih rezultata procijenjena je konstanta brzine deaktivacije lipaze ( $k_d = 0,0044 \pm 0,0007 \text{ 1/}^\circ\text{C}$ ) prema kojoj je potvrđena termička stabilnost proizvedenog enzima. Termička stabilnost lipaze zabilježena i u drugim istraživanjima (Denčić i sur., 2013) koja je povezana s biokemijskom strukturom molekule. Lipaza je amfifilna molekula koja sadrži hidrofilne i lipofilne aminokiselinske bočne ogranke (Khan i sur., 2017). Istraživanja su pokazala da lipofilne aminokiselinske skupine povećavaju termostabilnost proteina (Kumar i sur., 2000). Uzevši u obzir navedene rezultate, potvrđena je činjenica da je TLL termostabilan protein koji se može primijeniti u biokatalitičkim procesima u širokom temperaturnom rasponu, ovisno o drugim reakcijskim parametrima.

#### 4.2.4.3. Ovisnost aktivnosti lipaze o pH

Eksperimentalno ispitivanje utjecaja pH na aktivnost lipaze provedeno je u rasponu od 7 do 10. Prema dobivenim rezultatima (**Slika 22c**) može se zaključiti da nepročišćena TLL pokazuje maksimalnu hidrolitičku aktivnost prema *p*NP-palmitatu pri pH = 9. Dobiveni podaci za nepročišćenu lipazu u dobrom su slaganju s eksperimentalnim podacima dobivenim za komercijalnu lipazu opisanim u poglavlju 4.1.3. (**Tablica 17**).

#### 4.2.4.4. Stabilnost lipaze tijekom skladištenja

Stabilnost nepročišćene lipaze tijekom skladištenja ispitana je pri temperaturama od 25 °C, 4 °C i -20 °C periodičkim mjerenjem aktivnosti TLL tijekom 100 dana. Rezultati su prikazani na **Slici 22d** te su korišteni u svrhu procjene konstante deaktivacije lipaze ( $k_d$ ). U prvih 20 dana skladištenja pri testiranim temperaturama aktivnost TLL nije se promijenila. Nakon toga došlo je do redukcije aktivnosti lipaze s najvećim trendom redukcije skladištenjem tekućeg enzimskog ekstrakta pri

temperaturi od 25 °C ( $k_d = 0,0056 \pm 0,0004$  1/dan) te pri temperaturi od 4 °C uz blaži trend redukcije aktivnosti ( $k_d = 0,0042 \pm 0,0003$  1/dan). Skladištenjem enzimskog ekstrakta na temperaturi od -20 °C, TLL zadržava početnu aktivnosti tijekom 60 dana. Nakon 100 dana skladištenja, TLL zadržava 90% početne aktivnosti uz konstantu deaktivacije  $k_d = 0,0008 \pm 0,0002$  1/dan. Na temelju procijenjenih konstanti deaktivacije za svaku temperaturu, izračunato je vrijeme tijekom kojega dolazi do redukcije aktivnosti TLL za 50% te iznosi 124 dana za 25 °C, 165 dana za 4 °C i 866 dana za -20 °C.

#### 4.2.4.5. Utjecaj organskih otapala na aktivnost lipaze

Stabilnost nepročišćene TLL u prisutnosti organskog otapala procijenjena je nakon inkubacije enzimskog ekstrakta u trajanju od 60 minuta pri 25 °C i dodatkom 1% (v/v) otapala (acetona, acetonitril, etanol, heksan, heptan, kloroform, metanol, toluen). Prema rezultatima (**Slika 22e**) može se zaključiti da je TLL stabilan enzim u prisutnosti ispitivanih organskih otapala. Budući da je lipaza enzim koji može katalizirati reakcije esterifikacije i transesterifikacije u reakcijskom mediju s malim udjelom vode, za daljnja istraživanja bilo bi neophodno ispitati stabilnost i aktivnost lipaze u prisutnosti većeg udjela organskog otapala u reakcijskom mediju.

#### 4.2.4.6. Utjecaj iona metala na aktivnost lipaze

Prema provedenim istraživanjima (Yang i sur., 2016) dokazano je ioni metala mogu dolaziti u interakciju s nabijenim skupinama bočnog lanca površinskih aminokiselina lipaze, što bi moglo znatno utjecati na ionizaciju aminokiselinskih ostataka te utjecati na konformaciju enzima i aktivnost lipaze. Iz navedenog razloga, u ovom istraživanju ispitana je stabilnost nepročišćene TLL u prisutnosti različitih iona metala u koncentraciji od 2,22 mmol/dm<sup>3</sup> u reakcijskoj smjesi. Rezultati su prikazani grafički (**Slika 22f**) kao relativna aktivnost lipaze izračunata u usporedbi s aktivnošću lipaze izmjerenom bez dodatka anorganskih spojeva (100%). Prema dobivenim rezultatima, jednovalentni ioni metala K<sup>+</sup> (KCl) i Na<sup>+</sup> (NaCl) pokazuju najveći inhibicijski učinak na TLL (redukcija aktivnosti TLL za 93% i 94%). Od testiranih dvovalentnih iona metala, Mg<sup>2+</sup> (MgSO<sub>4</sub>) pokazao se kao jak inhibitor za nepročišćenu TLL s redukcijom hidrolitičke aktivnosti za 93%. Također, dvovalentni ioni Cu<sup>2+</sup> (CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O) rezultirali su redukcijom aktivnosti TLL za 84%. Dvovalentni ioni Mn<sup>2+</sup> (MnSO<sub>4</sub>) nisu djelovali inhibicijski na aktivnost lipaze nego je zabilježen blagi porast aktivnosti lipaze za 14%. Rezultati za dvovalentne ione Zn<sup>2+</sup> pokazali su smanjenje hidrolitičke aktivnosti TLL ali s manjim inhibicijskim učinkom kad su ioni dodani u obliku

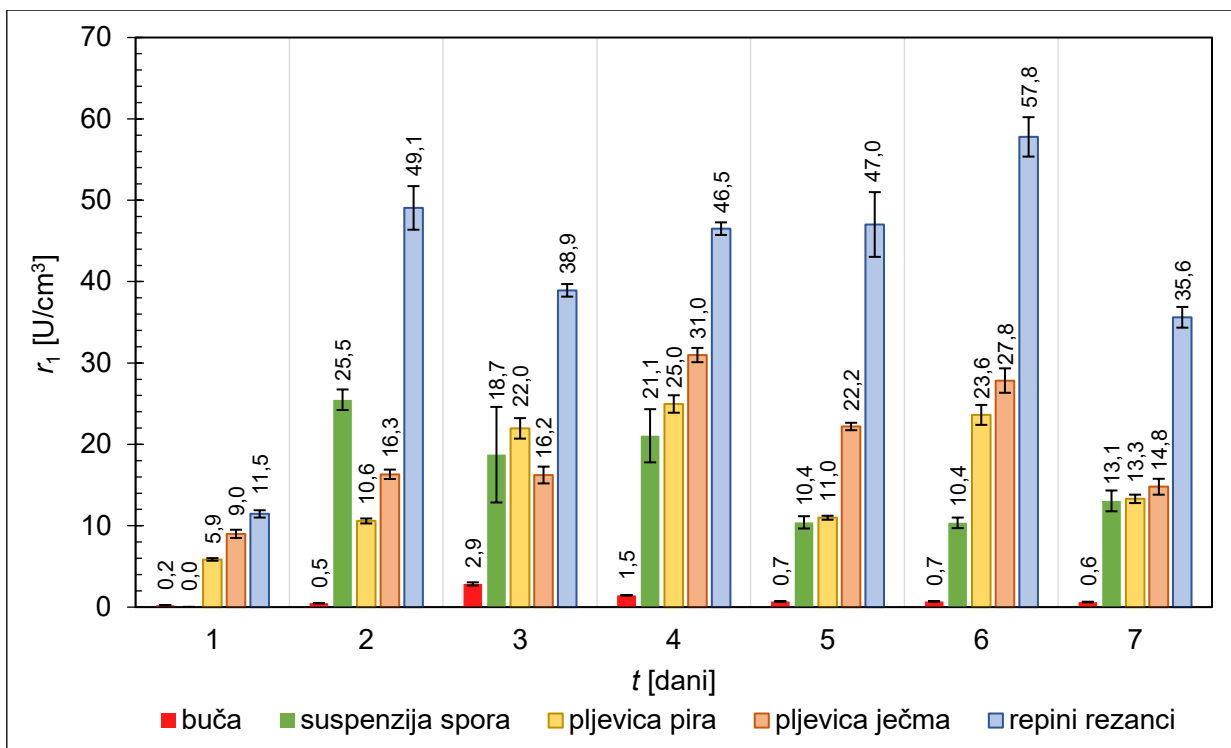
sulfata ( $ZnSO_4$ ) usporedno s kloridima ( $ZnCl_2$ ). Trovalentni ioni metala  $Fe^{3+}$  ( $FeCl_3$ ) pozitivno su djelovali na hidrolitičku aktivnost TLL te se aktivnost lipaze povećala za 33%.

### 4.3. BIOLOŠKA OBRADA BUČINE POGAČE U BIOREAKTORU S PLITICAMA

U sljedećoj fazi istraživanja ispitana je mogućnost uvećanja mjerila proizvodnje lipaze. Za potrebe optimizacije uvjeta fermentacije kao bioreaktor korištena je laboratorijska staklenka te je provedena fermentacija supstrata ukupne mase od 119 g (50 g bučine pogače + 69 g vode). U svrhu uvećanja mjerila SSF procesa, biološka obrada bučine pogače provedena je u bioreaktoru s pliticama. Razvoj procesa biološke obrade bučine pogače u bioreaktoru s pliticama proveden je u dvije faze. U prvoj fazi istraživana je utjecaj načina pripreme inokuluma na proizvodnju lipaze uzgojem *T. lanuginosus* na 600 g bučine pogače tijekom 7 dana u pliticama manjih dimenzija (27,5 × 1,5 × 18,5 cm) (poglavlje 3.2.8.1.). U tu svrhu, plitice manjih dimenzija postavljene su na srednju pliticu većih dimenzija u termostatskoj komori bioreaktora. Nakon odabira načina pripreme inokuluma s ciljem maksimalne proizvodnje lipaze, provedeno je uvećanje mjerila proizvodnje lipaze uzgojem *T. lanuginosus* na 2550 g bučine pogače tijekom 7 dana u pliticama većih dimenzija (50 × 5 × 40 cm) (poglavlje 3.2.8.2.).

#### 4.3.1. Utjecaj pripreme inokuluma na proizvodnju lipaze u bioreaktoru s pliticama

U ovom dijelu istraživanja procijenjena je mogućnost korištenja lignoceluloznih sirovina distinktivnih fizikalno-kemijskih karakteristika kao supstrata za uzgoj micelija i spora *T. lanuginosus* u svrhu pripreme inokuluma za uvećanje mjerila SSF procesa. Korištenje drugih nusproizvoda ili ostataka iz poljoprivredno-prehrambenog sektora u predloženom SSF procesu dodatno doprinosi razvoju opsega lignocelulozne biorafinerije. Rezultati mjerenja aktivnosti TLL tijekom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama kao funkcija u ovisnosti o načinu pripreme inokuluma prikazani su grafički na **Slici 23**.



**Slika 23.** Ovisnost proizvodnje lipaze uzgojem *T. lanuginosus* na bučinoj pogači u bioreaktoru s pliticama tijekom 7 dana fermentacije o načinu pripreme inokuluma (suspenzija spora *T. lanuginosus* i različiti lignocelulozni supstrati)

U prvom eksperimentu proizvodnja inokuluma i supstrata bila je analogna proizvodnji lipaze u laboratorijskim staklenkama. Bučina pogača inokulirana je suspenzijom spora *T. lanuginosus*. Prema rezultatima, najveća volumna aktivnost TLL izmjerena je nakon drugog dana fermentacije. Aktivnost lipaze proizvedene u bioreaktoru s pliticama bila je veća (22,5 U/cm<sup>3</sup>), usporedno s maksimalnom aktivnosti TLL provedbom SSF procesa u laboratorijskim staklenkama (15,77 U/cm<sup>3</sup>). U nastavku fermentacije, uslijedila je redukcija aktivnosti TLL. Isti trend proizvodnje lipaze evidentiran je provedbom SSF procesa u laboratorijskim staklenkama. Veća volumna aktivnost TLL zabilježena provedbom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama može se povezati sa sljedećim tvrdnjama. Usporedno sa SSF procesom provedenog u laboratorijskim staklenkama, cjelokupna masa supstrata postavljena je na pliticu većeg volumena nego što je volumen laboratorijske staklenke. Samim time, u bioreaktoru s pliticama dobivena je manja visina sloja fermentacijskog materijala te veći omjer dodirne površine supstrata i okolnog zraka. Navedene činjenice doprinose boljoj izmjeni tvari i energije tijekom SSF procesa. Osim toga, volumen cjelokupnog bioreaktora s pliticama puno je veći u odnosu s ukupnim volumenom laboratorijske staklenke. Iz navedenog razloga, sastav atmosfere okolnog zraka tijekom fermentacije u bioreaktoru s pliticama nije isti

kao u laboratorijskim staklenkama nastao uslijed produkcije i akumulacije plinova metabolizma radnog mikroorganizma. Osim toga, u bioreaktoru s pliticama omogućena je veća relativna vlažnost okolnog zraka induciranim ovlaživanjem.

Redukcija aktivnosti TLL tijekom proizvodnje u bioreaktoru s pliticama može se povezati s:

- a) Potrošnjom nutrijenata i ulja iz supstrata potrebnih za proizvodnju lipaze tijekom SSF procesa;
- b) Sintezom proteolitičkih enzima koji djeluju inhibicijski za lipazu;
- c) Sintezom drugih metabolita *T. lanuginosus* koji djeluju inhibicijski za lipazu;
- d) Sintezom ili otpuštanjem bioaktivnih spojeva supstrata koji mogu djelovati supresivno za proizvodnju lipaze ili inhibitorski za aktivnost lipaze, odnosno promjenom kemijskog sastava bučine pogače tijekom fermentacije.

U drugom eksperimentu kao supstrat za proizvodnju inokuluma korištena je bučina pogača. Nakon 7 dana uzgoja *T. lanuginosus* na bučnoj pogači u svrhu proizvodnje inokuluma, svježa bučina pogača inokulirana je te je proveden SSF proces u bioreaktoru s pliticama. Nakon provedbe mjerenja aktivnosti TLL, vidljivo je da primjena bučine pogače u svrhu proizvodnje inokuluma nije djelovala pozitivno na SSF proces u smjeru proizvodnje lipaze. Maksimalna aktivnost TLL izmjerena je nakon trećeg dana fermentacije te je iznosila  $2,9 \text{ U/cm}^3$ . Dobiveni rezultati ukazuju na činjenicu da do redukcije proizvodnje ili aktivnosti lipaze nije došlo kao posljedica potrošnje nutrijenata potrebnih za proizvodnju lipaze ili potrošnjom ulja iz supstrata kao induktora za proizvodnju lipaze. Navedene činjenice su opravdane budući da je u proces fermentacije dodana nova količina svježe bučine pogače. Nadalje, u ovoj fazi istraživanja, inhibicija lipaze ili redukcija proizvodnje lipaze može biti povezana sa sintezom proteaza ili drugih metabolita gljive tijekom uzgoja *T. lanuginosus* na bučnoj pogači za proizvodnju inokuluma. Također, tijekom pripreme inokuluma, moglo je doći do sinteze ili otpuštanja bioaktivnih spojeva iz bučine pogače koji mogu potencijalno djelovati inhibitorski na proizvodnju lipaze. Navedene činjenice su opravdane budući da u prvim danima SSF procesa nije niti došlo do značajne proizvodnje lipaze.

U trećem i četvrtom eksperimentu za proizvodnju inokuluma korišteni su nusprodukti iz poljoprivredno-prehrambenog sektora, pljevica pira i pljevica ječma. Usporedno s primjenom bučine pogače kao supstrata za proizvodnju inokuluma, primjena pljevice pira i pljevice ječma djelovala je pozitivno u smjeru proizvodnje TLL visoke volumne aktivnosti. Prema dobivenim rezultatima, najveća aktivnost lipaze zabilježena je nakon četvrtog dana fermentacije i iznosila je  $25,0 \text{ U/cm}^3$  za pljevicu pira, te  $31,0 \text{ U/cm}^3$  za pljevicu ječma. U nastavku SSF procesa zabilježena je redukcija aktivnosti lipaze ali s manjim trendom usporedno s proizvodnjom lipaze u laboratorijskim staklenkama.



U petom eksperimentu za proizvodnju inokuluma korišteni su repini rezanci, nusprodukt prehrambene industrije nastao tijekom proizvodnje industrijskog šećera saharoze. Prema dobivenim rezultatima, primjena repinih rezanaca kao inokuluma djelovala je pozitivno za proizvodnju TLL. Štoviše, primjenom repinih rezanaca postignuta je najveća aktivnost TLL u usporedbi s ostalim načinima pripreme inokuluma. Do intenzivne produkcije lipaze došlo je između prvog ( $11,5 \text{ U/cm}^3$ ) i drugog dana ( $49,1 \text{ U/cm}^3$ ) SSF procesa. Nakon drugog dana, aktivnosti lipaze ostala je konstanta do petog dana fermentacije. Manja odstupanja aktivnosti lipaze tijekom fermentacije te povećanje aktivnosti šestog dana SSF procesa ( $57,8 \text{ U/cm}^3$ ) može se povezati s problemima uzorkovanja zbog heterogenosti sustava. Sedmi dan fermentacije zabilježena je redukcija aktivnosti lipaze što je bio slučaj i kod ostalih ispitanih načina pripreme inokuluma.

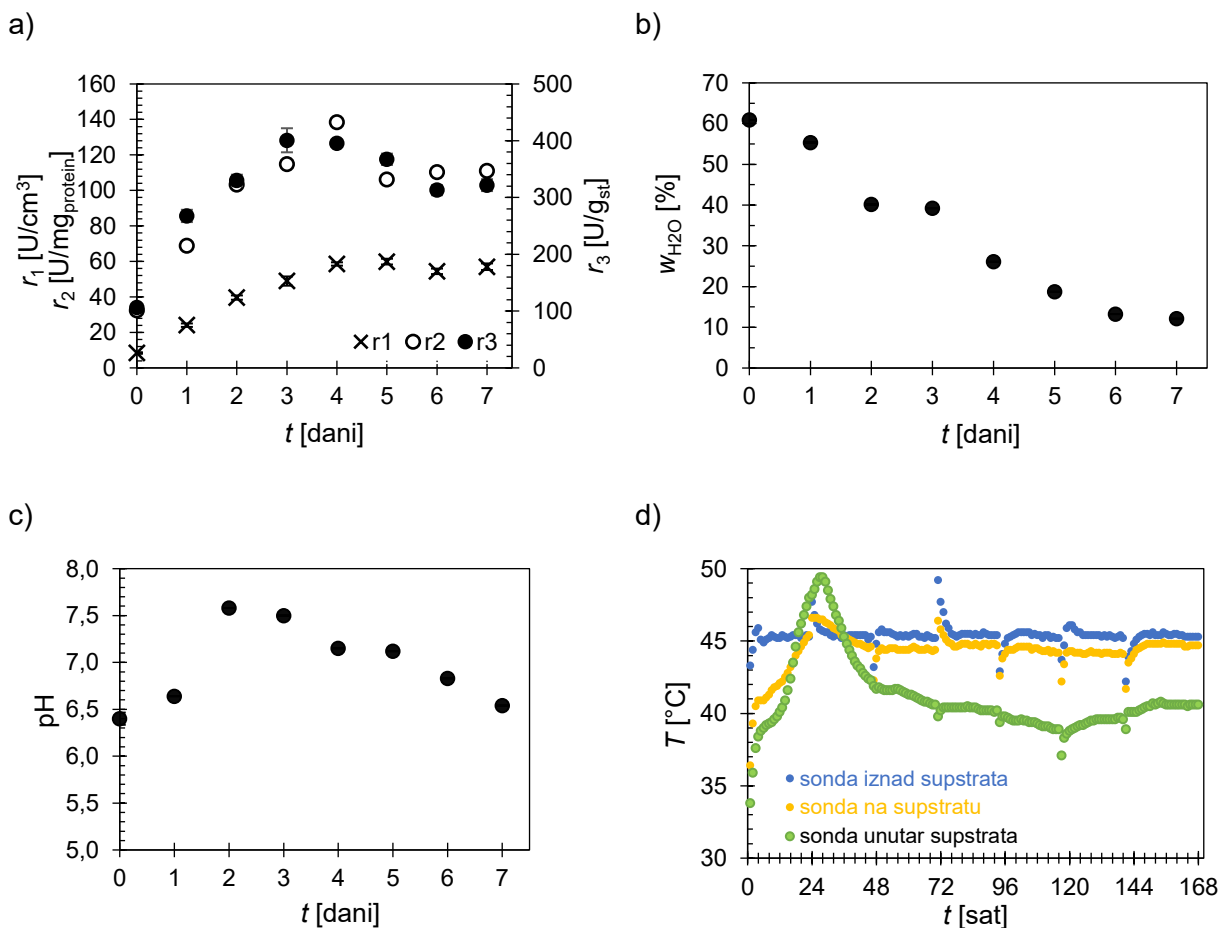
Sumirajući rezultate dobivene primjenom pljevice pira, pljevice ječma i repinih rezanaca za proizvodnju inokuluma, te usporedno s prethodno dobivenim rezultatima postavljene su sljedeće premise:

- a) Primjenom pljevice pira, pljevice ječma i repinih rezanaca nije došlo do sinteze proteolitičkih enzima tijekom pripreme inokuluma budući da nije došlo do inhibicije lipaze u početku SSF procesa na bučinoj pogači;
- b) Primjenom pljevice pira, pljevice ječma i repinih rezanaca nije došlo do sinteze metabolita gljive tijekom pripreme inokuluma budući da nije došlo do inhibicije proizvodnje lipaze u početku SSF procesa na bučinoj pogači;
- c) Primjenom pljevice pira, pljevice ječma i repinih rezanaca nije došlo do sinteze ili otpuštanja bioaktivnih komponenti korištene sirovine koji bi potencijalno inhibirali proizvodnju ili aktivnost lipaze;
- d) Primjenom repinih rezanaca kao supstrata za proizvodnju inokuluma uspostavljen je stabilan SSF proces u pogledu proizvodnje lipaze s najvećom volumnom aktivnosti te minimalne redukcije u aktivnosti lipaze tijekom fermentacije.

Iz dobivenih rezultata te navedenih premisa, repini rezanci, kao lignocelulozni nusprodukt prehrambene industrije, korišteni su u daljnjim koracima uvećanja mjerila proizvodnje lipaze.

### 4.3.2. Uvećanje mjerila procesa biološke obrade bučine pogače u bioreaktoru s pliticama

Nakon optimizacije procesnih uvjeta proizvodnje lipaze u laboratorijskim staklenkama, ispitana je mogućnost uvećanja mjerila SSF procesa u bioreaktoru s pliticama. Početna masa supstrata u laboratorijskim staklenkama iznosila je 119 g, te je povećana na 2550 g u bioreaktoru s pliticama. Uzevši u obzir masu dodanog inokuluma (repini rezanci + biomasa radnog mikroorganizma) (1350 g), početna masa tvari na plitici iznosila je 3900 g s udjelom inokuluma 34,62% (w/w) izraženo na ukupnu masu. Prema tome, proces proizvodnje lipaze uvećan je 32,77 puta. Tijekom procesa biološke obrade bučine pogače u bioreaktoru s pliticama provedena su mjerenja aktivnosti lipaze, udjela vlage supstrata, pH supstrata te je praćena promjena temperature. Rezultati su prikazani grafički na **Slici 24**. Rezultati prikazani za dan fermentacije "0" odnosi se na uzorkovanje provedeno odmah nakon inokulacije bučine pogače neposredno prije inkubacije i fermentacije.



**Slika 24.** Rezultati procesa proizvodnje lipaze biološkom obradom bučine pogače u bioreaktoru s pliticama tijekom 7 dana primjenom repinih rezanaca kao sirovine za proizvodnju inokuluma:

a) Profil proizvodnje lipaze; b) Promjena udjela vlage supstrata; c) Promjena pH vrijednosti supstrata; d) Promjena temperature supstrata

#### 4.3.2.1. Proizvodnja lipaze u bioreaktoru s pliticama

Prema rezultatima (**Slika 24a**) najveća volumna aktivnost TLL izmjerena je četvrti dan fermentacije ( $58,55 \text{ U/cm}^3$ ), te u nastavku fermentacije nije došlo do značajne promjene volumne aktivnosti TLL. Usporedno, maksimalna aktivnost lipaze izmjerena u laboratorijskim staklenkama iznosila je  $15,77 \text{ U/cm}^3$ . U bioreaktoru s pliticama proizvedena je lipaza sa 3,7 puta većom volumnom aktivnosti te nije zabilježena inhibicija proizvedene lipaze kao što je to bio slučaj tijekom SSF procesa provedenog u laboratorijskim staklenkama. Najveća specifična aktivnost TLL u bioreaktoru s pliticama izmjerena je četvrti dan fermentacije ( $138,46 \text{ U/mg}_{\text{protein}}$ ), te je usporedno s izmjerenom specifičnom aktivnosti u laboratorijskim staklenkama ( $26,94 \text{ U/mg}_{\text{protein}}$ ) došlo do povećanja specifične aktivnosti TLL za 5,14 puta. Maksimalna aktivnost TLL izražena na suhu tvar supstrata izmjerena je nakon trećeg dana provedbe procesa u bioreaktoru s pliticama ( $400,83 \text{ U/g}_{\text{st}}$ ) te je bila veća za 2,47 puta usporedno s procesom provedenim u laboratorijskim staklenkama ( $162,15 \text{ U/g}_{\text{st}}$ ). U nastavku SSF procesa, došlo je do smanjenja specifične aktivnosti TLL ( $r_2$ ) i aktivnosti lipaze izražene na suhu tvar supstrata ( $r_3$ ).

#### 4.3.2.2. Promjena udjela vlage supstrata tijekom proizvodnje lipaze u bioreaktoru s pliticama

Prema rezultatima (**Slika 24b**), udio vlage u početnom uzorku iznosio je 60%. Tijekom SSF procesa došlo je do redukcije vlage supstrata te je udio vlage u uzorku izmjerenom nakon sedmog dana SSF procesa iznosio 12,11%. Usporedno sa SSF procesom provedenim u laboratorijskim staklenkama, udio vlage supstrata iznosio je 41,01% u uzorku izmjerenom nakon sedmog dana SSF procesa. Veći trend redukcije vlage supstrata u bioreaktoru s pliticama može se povezati s činjenicama da je SSF proces proveden na plitici koja omogućuje veću dodirnu površinu između supstrata i okolnog zraka pri temperaturi od  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kombinacija tanjeg sloja fermentacijskog materijala na plitici nego u laboratorijskoj staklenki i bolje izmjene tvari i energije rezultirala je većim trendom isušivanja materijala unatoč ovlaživanju zraka u termostatskoj komori bioreaktora. Isti rezultati zabilježeni su u istraživanju provedenog od grupe autora Šelo i sur. (2023). Veći trend smanjenja udjela vlage supstrata zabilježen je tijekom biološke valorizacije tropa grožđa u bioreaktoru s pliticama (10,1%) usporedno s laboratorijskim staklenkama (2,3%) nakon 15 dana fermentacije pri  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.2.3. Promjena pH supstrata tijekom proizvodnje lipaze u bioreaktoru s pliticama

Tijekom SSF procesa mjerena je pH vrijednost supstrata. Prema rezultatima (**Slika 24c**), pH početnog uzorka bio je 6,40. Nakon drugog dana SSF procesa došlo je do povećanja pH na 7,58. Od drugog dana do sedmog dana SSF procesa zabilježena je redukcija pH supstrata do 6,54. Usporedno, tijekom provedbe SSF procesa u laboratorijskim staklenkama zabilježen je porast pH do drugog dana fermentacije (8,60) te u nastavku SSF procesa pH vrijednost nije se značajno promijenila i kraju je iznosila 8,27. Istraživanja su pokazala da pH vrijednost supstrata može značajno utjecati na tijek proizvodnje i aktivnost lipaze uzgojem različitih sojeva *T. lanuginosus* (Sreelatha i sur., 2017). Prema dobivenim rezultatima kojega su proveli Sreelatha i sur. (2017), najveće aktivnosti lipaze zabilježene su submerznim uzgojem *T. lanuginosus* u mediju pri pH od 6 do 7. Također, najveći porast biomase gljive zabilježen je u istom pH rasponu. Pri pH vrijednosti 8, zabilježena je redukcija u proizvodnji biomase gljive i produkciji lipaze. Budući da je tijekom proizvodnje lipaze u bioreaktoru s pliticama zabilježena niža pH vrijednost supstrata i veća aktivnost TLL nego tijekom SSF procesa u laboratorijskim staklenkama, potvrđeno je da niža pH vrijednost supstrata doprinosi većoj produkciji TLL. Povećanje pH supstrata tijekom SSF procesa može biti indicacija aktivnosti proteolitičkih enzima koji mogu potencijalno inhibirati lipazu. Tijekom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama osim veće aktivnosti TLL, nije zabilježena inhibicija lipaze kao što je to u slučaju provedbe fermentacije u laboratorijskim staklenkama. Smanjenje pH vrijednosti tijekom procesa fermentacije može biti posljedica veće produkcije i akumulacije ugljikova dioksida u okolnoj atmosferi unutar bioreaktora s pliticama te otapanjem ugljikova dioksida u slobodnoj vodi prisutnoj u supstratu. Usporedno sa SSF procesom u laboratorijskim staklenkama, u bioreaktoru s pliticama je došlo do veće produkcije lipaze, što sugerira na veću metaboličku aktivnost gljive. Samim time došlo je do potencijalne veće produkcije ugljikova dioksida što je rezultiralo smanjenjem pH supstrata, dok je pH supstrata tijekom procesa u laboratorijskim staklenkama ostao konstantan. Osim toga, tijekom fermentacije i metaboličke aktivnosti može doći do sinteze i akumulacije organskih kiselina što rezultira sniženjem pH fermentacijskog medija. Promjena koncentracije organskih kiselina zabilježena je tijekom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama, te su dobiveni rezultati prikazani u poglavlju 4.6.12.

#### 4.3.2.4. Mjerenje temperature supstrata tijekom proizvodnje lipaze u bioreaktoru s pliticama

SSF proces u bioreaktoru s pliticama proveden je pri temperaturi od 45 °C, a fluktuacija temperature tijekom fermentacije mjerena je *on-line* posredstvom tri temperaturene sonde. Kontrolna sonda postavljena je u središte termostatske komore bioreaktora 20 cm iznad supstrata

te služi za regulaciju temperature u bioreaktoru. Druga sonda postavljena je na površinu supstrata, a treća sonda postavljena je unutar sloja supstrata. Rezultati mjerenja fluktuacije temperature prikazani su na **Slici 24d**. Prema rezultatima mjerenja provedenih pomoću kontrolne temperature sonde vidljivo je da tijekom SSF procesa nije došlo do akumulacije topline unutar bioreaktora. Izmjerene oscilacije temperature od 45 °C očitane pomoću kontrolne sonde posljedica su otvaranja bioreaktora u namjenu svakodnevnog uzorkovanja supstrata. Prema rezultatima dobivenih pomoću temperature sonde postavljene na površini supstrata vidljivo je da je temperatura od 45 °C postignuta nakon 20 h trajanja fermentacije, uz blago povećanje temperature do 46,5 °C. Tijekom SSF procesa, temperatura na površini supstrata iznosila je oko 44,5 °C. Rezultati dobiveni mjerenjem promjene temperature unutar sloja fermentacijskog materijala tijekom provedbe SSF procesa u bioreaktoru s pliticama ukazuju na jednu od glavnih problematika povezanih s provedbom SSF procesa u bioreaktoru statične konstrukcije (bez mehaničkog miješanja fermentacijskog materijala te uz prirodnu cirkulaciju zraka konvekcijom unutar bioreaktora) te uvećanjem mjerila procesa fermentacije. Prema rezultatima mjerenja temperature sonde postavljene u središte supstrata očitana je akumulacija metaboličke topline u prvih 29 sati fermentacije kao porast temperature do 49,4 °C. Akumulacija topline unutar sloja supstrata može rezultirati inhibicijom enzima ili metaboličke aktivnosti radnog mikroorganizma. Prema rezultatima vidljivo je da je temperatura od 45 °C unutar supstrata postignuta 37. sat fermentacije. Odnosno, bilo je potrebno 8 sati SSF procesa da se postigne radna temperatura unutar sloja fermentacijskog materijala. Navedeno se može povezati s toplinskom vodljivošću fermentacijskog medija koji utječe na prijenos topline kroz fermentacijski materijal kondukcijom i prijenos topline između fermentacijskog materijala i okolnog zraka konvekcijom. Samim time, moguća je heterogenost, odnosno temperaturni gradijenti unutar fermentacijskog materijala, što je jedan od glavnih nedostataka konstrukcije statičnog bioreaktora (Figuroa-Montero i sur., 2011). U nastavku SSF procesa, temperatura u sloju supstrata iznosila je oko 40 °C. Sniženje temperature unutar sloja fermentacijskog medija može se povezati s utroškom osjetne topline fermentacijskog materijala u korist latentne topline isparavanja vode s površine fermentacijskog materijala (Nagel i sur., 2000b). Kao posljedica fenomena hlađenja fermentacijskog materijala, zabilježen je znatan gubitak vlage supstrata isparavanjem vode. Stopa hlađenja isparavanjem može se kontrolirati reguliranjem brzine protoka zraka prisilnom ventilacijom te kontrolom sadržaja vode u mediju. Povećanje brzine protoka zraka prisilnom ventilacijom moglo bi smanjiti temperaturni gradijent unutar sloja supstrata. Međutim, provedbom SSF procesa u velikom mjerilu teško je održavati temperaturu u idealnom rasponu (Chen, 2013).

## 4.4. BIOTRANSFORMACIJA ULJA KATALIZIRANA POMOĆU LIPAZE

Proizvodnja kemikalija iz obnovljivih izvora poput otpadnih ulja i masti ključna je u razvoju održivih procesa nezavisnih o fosilnim izvorima (poput nafte i prirodnog plina). U takvim okolnostima, razvoj selektivnih i efikasnih transformacija triacilglicerola i masnih kiselina nužni su za uspostavu ekološki plauzibilnih i održivih industrijskih procesa. Razvijeni industrijski procesi transformacija ulja i masti do visokovrijednih produkata konfrontiraju se s intenzivnim energetskim imperativima (visoki tlakovi i temperature), potrošnjom kemikalija, zahtjevima u izolaciji i pročišćavanju finalnih derivata te sintezom nepoželjnih nusprodukata (Fraile i sur., 2017). Navedeni nedostaci mogu se premostiti implementacijom biokatalitičkih procesa u kojima se kao katalizator koristi enzim lipaza. Biokatalitički procesi obično su energetski plauzibilniji u smislu potrošnje energije. Osim toga, selektivnost biotehnoških procesa u sintezi primjenom enzima rezultira povećanjem prinosa željenih proizvoda, minimizirajući postupke separacije i pročišćavanja produkta što u konačnici rezultira redukcijom akumulacije kemijskog otpada. Iz gore navedenih razloga, proizvedena lipaza testirana je kao biokatalizator za hidrolizu različitih biljnih ulja (hladno prešano suncokretovo ulje, omegol ulje, hladno prešano ulje konoplje, ekstra djevičansko maslinovo ulje, djevičansko bučino ulje, hladno prešano laneno ulje, rafinirano kokosovo ulje) s ciljem ispitivanja supstratne specifičnosti proizvedene TLL. RSM optimizacija procesnih uvjeta biokatalitičke hidrolize biljnih ulja provedena je primjenom modelnog supstrata (hladno prešano suncokretovo ulje).

### 4.4.1. Priprema i karakterizacija nepročišćenog liofiliziranog ekstrakta lipaze

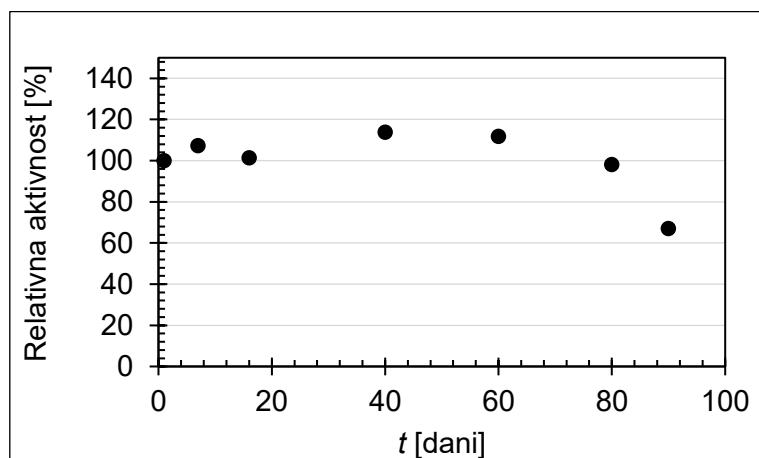
U narednom odjeljku opisani su argumenti koncentriranja enzimskog pripravka liofilizacijom te su izneseni ishodi mjerenja volumne aktivnosti TLL prije i nakon liofilizacije. U tu namjenu, proveden je postupak liofilizacije opisan u poglavlju 3.2.9.1. Pripremljen liofilizat otopljen je u TRIS-HCl puferu ( $50 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 7,31$ ) u koncentraciji od  $112,66 \text{ mg/cm}^3$ . Odabrani pH i koncentracija liofilizata odgovaraju reakcijskim uvjetima dobivenim nakon RSM optimizacije hidrolize ulja pomoću TLL koja je sadržana u idućem poglavlju.

Izmjerena volumna aktivnost TLL u pripremljenom liofilizatu iznosila je  $14,60 \text{ U/cm}^3$ , dok je maksimalna volumna aktivnost TLL izmjerena tijekom biološke obrade bučine pogače iznosila  $58,55 \text{ U/cm}^3$ . Razlog smanjene volumne aktivnosti TLL u sirovom liofiliziranom enzimskom pripravku posljedica je provedbe ekstrakcije lipaze u vodi, za razliku od provedbe ekstrakcije lipaze u TRIS-HCl puferu ( $50 \text{ mmol/dm}^3$ ,  $\text{pH} = 9$ ) korištenom za mjerenje volumne aktivnosti TLL tijekom biološke obrade. Nakon provedene ekstrakcije lipaze u vodi, volumna aktivnost iznosila je

1,19 U/cm<sup>3</sup>. Primarni razlog provedbe ekstrakcije TLL u vodi temelji se na rezultatima mjerenja utjecaja pH vrijednosti na konverziju triacilglicerola tijekom hidrolize ulja. Prema rezultatima, veća konverzija triacilglicerola, a samim time i veća hidrolitička aktivnost TLL zabilježena je pri pH 7,31 tijekom hidrolize ulja. U suprotnosti, proizvedena TLL pokazala je maksimalnu hidrolitičku aktivnost pri pH 9 u slučaju kad je *p*NP-palmitat korišten kao supstrat za mjerenje aktivnosti. Iz navedenog razloga, ne može se izvesti zaključak da prilikom ekstrakcije u vodi nije došlo do ekstrakcije lipaze, nego je niža aktivnost zabilježena kao posljedica niže pH vrijednosti u odnosu na pH korišten pri mjerenju aktivnosti TLL primjenom *p*NP-palmitata u testu.

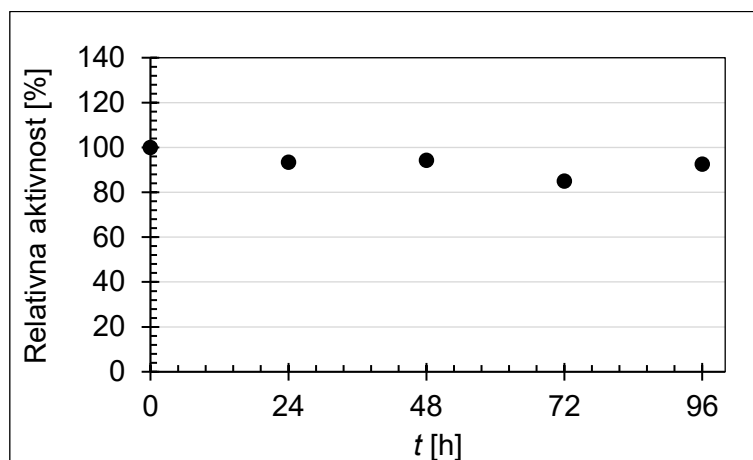
Da bi se povećala volumna aktivnost enzimskog pripravka TLL, provedeno je koncentriranje enzimskog ekstrakta liofilizacijom. U slučaju da je ekstrakcija TLL provedena u puferu (TRIS-HCl pufer, 50 mmol/dm<sup>3</sup>) to znači da bi liofilizacijom 1 dm<sup>3</sup> ekstrakta u puferu u sirovom liofiliziranom pripravku lipaze zaostalo 6,057 g TRIS baze. Iz navedenog razloga, bilo bi potrebno provesti dodatni korak pročišćavanja i uklanjanja velike količine soli što bi rezultiralo dodatnim koracima pripreme enzima, akumulacijom kemijskog otpada i potencijalnim gubitkom aktivnosti lipaze.

Osim zbog povećanja volumne aktivnosti TLL, postupak liofilizacije odabran je iz razloga da bi se povećala stabilnost enzimskog pripravka tijekom skladištenja. Prema dobivenim rezultatima mjerenja stabilnosti nepročišćenog enzimskog ekstrakta tijekom skladištenja na 4 °C (poglavlje 4.2.4.4., **Slika 22d**), zabilježena je redukcija aktivnosti TLL za 30% nakon 80 dana skladištenja. Prema dobivenim rezultatima mjerenja stabilnosti nepročišćenog liofiliziranog ekstrakta lipaze, tijekom 80 dana na 4 °C (**Slika 25**) nije zabilježena redukcija aktivnosti TLL. Nakon toga, uslijedila je redukcija aktivnosti TLL.



**Slika 25.** Stabilnost nepročišćenog liofiliziranog ekstrakta lipaze tijekom skladištenja pri temperaturi od 4 °C

Da bi se ispitala stabilnost liofiliziranog ekstrakta lipaze pri povišenoj temperaturi, liofilizat je otopljen u TRIS-HCl puferu (50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH = 7,31) u koncentraciji od 112,66 mg/cm<sup>3</sup>, inkubiran pri temperaturi od 40 °C te je periodički mjerena aktivnost lipaze. Prema dobivenim rezultatima mjerenja stabilnosti nepročišćenog enzimskog ekstrakta tijekom inkubacije na 40 °C (poglavlje 4.2.4.2., **Slika 22b**), zabilježena je redukcija aktivnosti TLL za 12% nakon 24h. Rezultati dobiveni mjerenjem stabilnosti nepročišćenog liofiliziranog ekstrakta lipaze tijekom inkubacije pri temperaturi od 40 °C (**Slika 26**) ukazuju na termostabilnost proizvedenog enzimskog pripravka budući da je TLL zadržala više od 92% početne aktivnosti nakon inkubacije u trajanju od 96 sati.



**Slika 26.** Stabilnost nepročišćenog liofiliziranog ekstrakta lipaze tijekom inkubacije pri temperaturi od 40 °C

#### 4.4.2. Rezultati hidrolize ulja pomoću lipaze prema procesnim uvjetima definiranim u Box-Behnken eksperimentalnoj matrici

U prvom djelu optimizacije hidrolize hladno prešanog suncokretovog ulja pomoću lipaze istražen je utjecaj 3 nezavisne varijable u 3 razine (maseni udio ulja ( $X_6$ ), maseni udio enzima ( $X_7$ ) i pH ( $X_8$ )) na konverziju triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina ( $Y$ ). U tu svrhu, definirana je eksperimentalna matrica prema Box-Behnken dizajnu prema kojemu je provedeno 18 eksperimenata sa 6 ponavljanja u centralnoj točki ispitnog područja. Rezultati mjerenja konverzije triacilglicerola prikazani su u **Tablici 23**. Prema rezultatima vidljiva je signifikantnost utjecaja procesnih uvjeta u definiranom ispitnom području na hidrolizu suncokretovog ulja. Navedena konstatacija proizlazi iz dobivenih eksperimentalnih rezultata konverzije triacilglicerola koji su bili u rasponu od 11,06% do 41,66%.



**Tablica 23.** Srednje vrijednosti konverzije triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina izračunate temeljem rezultata istraživanja utjecaja različitih procesnih uvjeta na hidrolizu suncokretovog ulja pomoću lipaze prema Box-Behnken dizajnu (eksperimentalna matrica)

broj eksperimenta	X <sub>1</sub> [%]	X <sub>2</sub> [%]	X <sub>3</sub> [-]	Y [%]
1	25	5,0	7,5	<b>29,02</b>
2*	50	7,5	7,5	<b>38,96</b>
3*	50	7,5	7,5	<b>37,03</b>
4*	50	7,5	7,5	<b>41,02</b>
5	75	7,5	9,0	<b>11,06</b>
6	75	7,5	6,0	<b>26,51</b>
7	25	7,5	9,0	<b>31,17</b>
8*	50	7,5	7,5	<b>41,66</b>
9	50	5,0	9,0	<b>19,93</b>
10	75	5,0	7,5	<b>18,85</b>
11	50	10,0	6,0	<b>14,41</b>
12	50	5,0	6,0	<b>29,45</b>
13	25	7,5	6,0	<b>31,89</b>
14*	50	7,5	7,5	<b>41,55</b>
15*	50	7,5	7,5	<b>39,58</b>
16	50	10,0	9,0	<b>12,80</b>
17	25	10,0	7,5	<b>27,86</b>
18	75	10,0	7,5	<b>16,35</b>

\*centralne točke ispitnog područja

#### 4.4.3. Modeliranje i statistička optimizacija procesnih uvjeta hidrolize ulja

Dobiveni eksperimentalni podaci konverzije triacilglicerola hladno prešanog suncokretovog ulja pomoću sirovog liofiliziranog pripravka lipaze aproksimirani su primjenom 4 modela (linearni, dvofaktorijalni, kvadratni i kubični model) te je provedena statistička analiza s ciljem definiranja koji od modela najbolje opisuje dobivene eksperimentalne podatke. Prema dobivenim rezultatima programskog paketa Design-Expert® (**Tablica 24**) odabran je kvadratni polinom.

**Tablica 24.** Procjena prikladnosti modela za opisivanje eksperimentalnih podataka hidrolize ulja

Model	SD	R <sup>2</sup>
linearni	10,131	0,2403
dvofaktorijalni	11,146	0,2775
<b>kvadratni</b>	<b>2,829</b>	<b>0,9662</b>
kubični	1,805	0,9914

SD = standardna devijacija; R<sup>2</sup> = koeficijent determinacije

Kvadratni polinom s konstantom jednadžbe odzivnog polinoma, linearnim članovima, kvadratnim članovima, članovima interakcije i pripadajućim koeficijentima regresije prikazani su općom formulom (53), te u nekodiranom obliku formulom (54):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_6 + \beta_2 X_7 + \beta_3 X_8 + \beta_1^2 X_6^2 + \beta_2^2 X_7^2 + \beta_3^2 X_8^2 + \beta_1 \beta_2 X_6 X_7 + \beta_1 \beta_3 X_6 X_8 + \beta_2 \beta_3 X_7 X_8 \quad (53)$$

$$Y = -289,31 + 1,42 \cdot X_6 + 22,56 \cdot X_7 + 60,94 \cdot X_8 + (-0,01 \cdot X_6^2) + (-1,84 \cdot X_7^2) + (-4,15 \cdot X_8^2) + (-0,01 \cdot X_6 X_7) + (-0,10 \cdot X_6 X_8) + 0,53 \cdot X_7 X_8 \quad (54)$$

Za verifikaciju signifikantnosti testiranih nezavisnih varijabli i njihova međudjelovanja na odziv korištene su *p*-vrijednosti. Prema rezultatima statističke analize prikazanih u **Tablici 25**, ispitane nezavisne varijable kao linearni članovi pokazuju statistički značajan utjecaj na proces hidrolize suncokretovog ulja (*p* < 0,05). Maseni udio ulja (*X*<sub>6</sub>) ima najveći utjecaj na proces hidrolize, nakon čega slijede pH (*X*<sub>8</sub>) i maseni udio enzima (*X*<sub>7</sub>). Zatim, statističkom analizom dokazano je da svi kvadratni članovi polinoma imaju signifikantan utjecaj na proces hidrolize te da najveći utjecaj na proces hidrolize ima međusobna interakcija ispitanih varijabli *X*<sub>6</sub> i *X*<sub>8</sub>.

"*F*-vrijednost" modela iznosi 25,38 (izračunat kao omjer kvadratne regresije modela (*MS* = 203,05) i kvadratnog ostatka (8,00)) što implicira da je model signifikantan sa samo 0,01% šanse da bi se "*F*-vrijednost" modela mogla pojaviti zbog "šuma modela". Vrlo niska "*P*-vrijednost modela" (< 0,0001) i *R*<sup>2</sup> = 0,9662 implicira da predloženi kvadratni model dobro opisuje odnos između promatranog odziva procesa (konverzija triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina) i utjecaja signifikantnih neovisnih varijabli te ovaj model može objasniti 96,62% promjenjivosti u odzivu. U konačnici, "*F*-vrijednost" (4,88) i "*P*-vrijednost" (0,0601) indicira na činjenicu da nedostatak modela nije signifikantan.

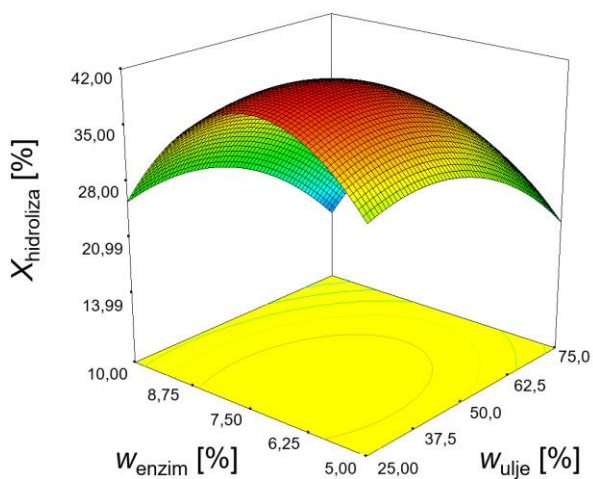
**Tablica 25.** Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije dobivenih eksperimentalnih podataka konverzije triacilglicerola nakon hidrolize suncokretovog ulja pomoću lipaze polinomnim modelom primjenom višestruke regresije

	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
Model	1827,46	9	203,05	25,38	< 0,0001
<i>Linearni članovi</i>					
$X_6$	277,99	1	277,99	34,73	0,0004
$X_7$	83,39	1	83,39	10,42	0,0121
$X_8$	93,15	1	93,15	11,64	0,0092
<i>Kvadratni članovi</i>					
$X_6^2$	130,48	1	130,48	16,30	0,0037
$X_7^2$	574,82	1	574,82	71,82	< 0,0001
$X_8^2$	380,68	1	380,68	47,57	0,0001
<i>Članovi interakcije</i>					
$X_6X_7$	0,45	1	0,45	0,06	0,8179
$X_6X_8$	54,19	1	54,19	6,77	0,0315
$X_7X_8$	15,67	1	15,67	1,96	0,1992
Ostatak	64,02	8	8,00		
Nedostatak modela	47,73	3	15,91	4,88	0,0601
Pogreška	16,28	5	3,25		
Ukupno	1891,48	17			
$R^2$	0,9662				

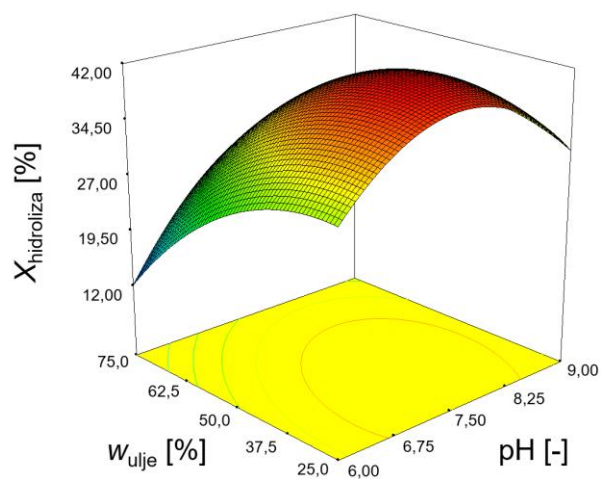
SS = suma kvadrata odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df = stupnjevi slobode;  
MS = varijanca

Međusobni utjecaj ispitanih nezavisnih varijabli na proces hidrolize ulja prikazani su trodimenzionalnim (3D) odzivnim površinama konstruiranih pomoću definiranog matematičkog modela (**Slika 27 a – c**).

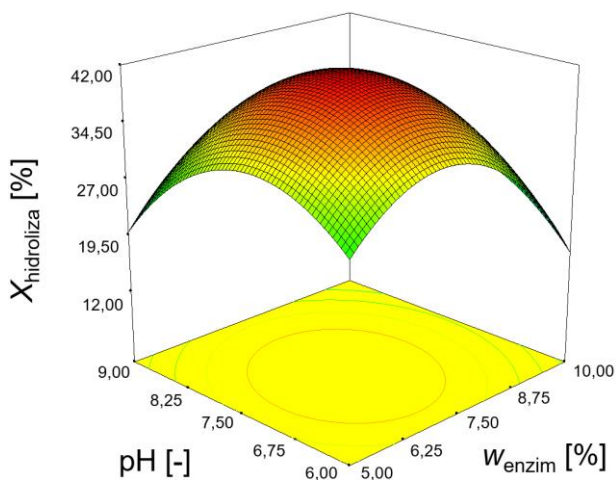
a)



b)



c)

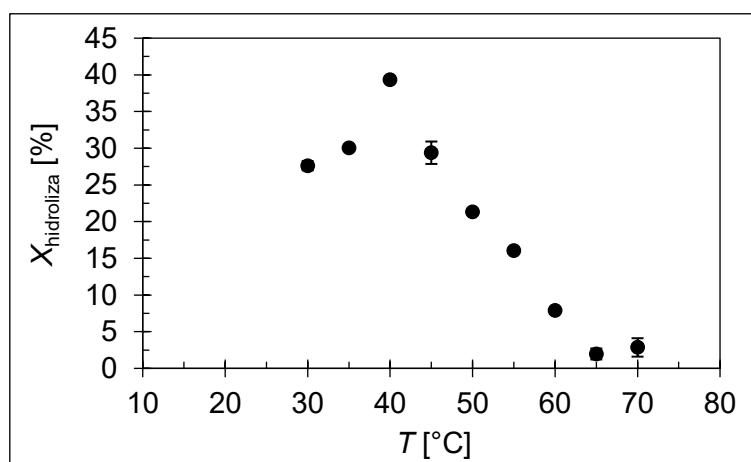


**Slika 27.** Trodimenzionalni dijagram odzivne površine za konverziju triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina dobiven numeričkom optimizacijom kao funkcija članova interakcije: a) masenog udjela enzima i masenog udjela ulja; b) masenog udjela ulja i pH; c) pH i masenog udjela enzima

Sukladno navedenim činjenicama, predloženi matematički model implementiran je u numeričkoj optimizaciji reakcijskih parametara hidrolize ulja s ciljem maksimalne konverzije triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina. Definirani optimalni uvjeti su:  $w_{ulje} = 37,69\%$ ,  $w_{enzim} = 7\%$ ,  $pH = 7,31$ . Prema predviđanju matematičkog modela i implementacijom definiranih uvjeta hidrolize ulja, maksimalna konverzija triacilglicerola iznosila bi 41,81%. Sukladno navedenom, provedena je provjera matematičkog modela prema definiranim optimalnim uvjetima te je izmjerena konverzija triacilglicerola od 39,32% što ukazuje kako je model sa 94,04% točnosti pokazao podudaranje s eksperimentalnim rezultatom.

#### 4.4.3.1. Utjecaj temperature na hidrolizu ulja

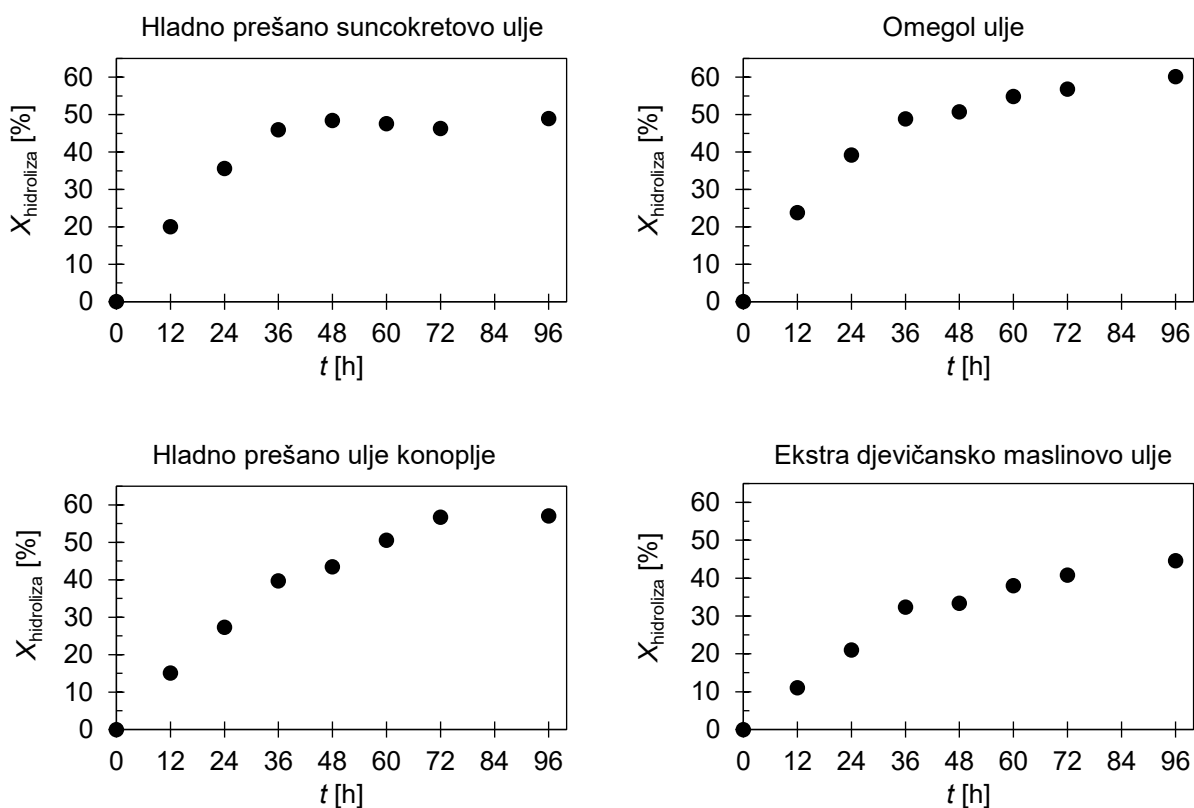
Nakon provedene RSM optimizacije reakcijskih uvjeta hidrolize ulja (maseni udio ulja, maseni udio enzima i pH), ispitan je utjecaj temperature na hidrolizu ulja. Tijekom optimizacije, reakcija hidrolize ulja provedena je pri temperaturi od 40 °C iz razloga što je u ranije provedenim analizama karakterizacije nepročišćene TLL (poglavlje 4.2.4.1.) utvrđeno da lipaza pokazuje maksimalnu hidrolitičku aktivnosti prema pNP-palmitatu pri 40 °C. Prema dobivenim rezultatima (**Slika 28**) maksimalna konverzija triacilglicerola izmjerena je pri temperaturi od 40 °C. Povećanje temperature rezultiralo je redukcijom hidrolitičke aktivnosti TLL u reakciji hidrolize hladno prešanog suncokretovog ulja.

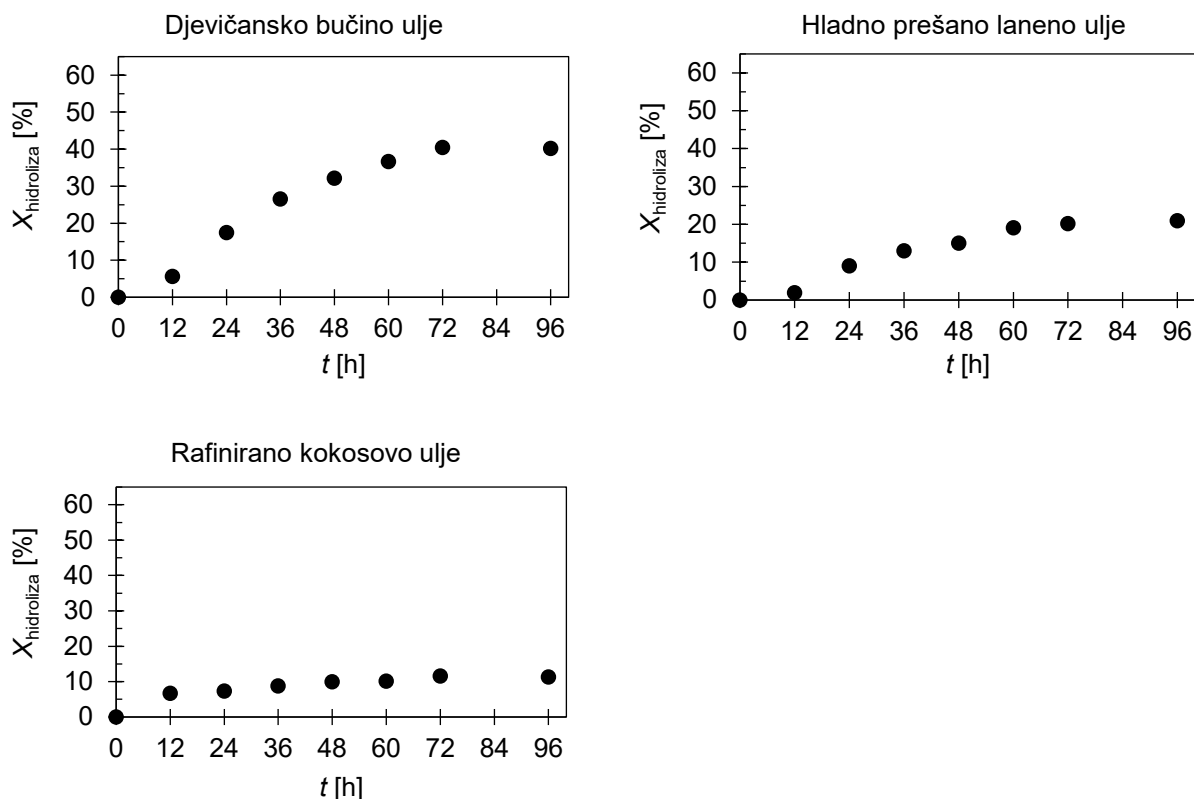


**Slika 28.** Ovisnost konverzije triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina u reakciji hidrolize hladno prešanog suncokretovog o temperaturi

#### 4.4.3.2. Hidroliza različitih vrsta ulja pomoću sirovog liofiliziranog preparata lipaze

Enzim lipaza klasificirana je kao triacilglicerol hidrolaza, te osim reakcije esterifikacije i transesterifikacije, lipaza katalizira reakciju hidrolize esterske veze u molekuli triacilglicerola. Nastale slobodne više masne kiseline i glicerol imaju značajnu primjenu u industrijskoj proizvodnji širokog spektra produkata poput alkohola, amina i estera koji u svojoj strukturi sadrže lipofilni ugljikovodični lanac. Dobivene kemikalije se koriste kao lubrikanti, plastifikatori i emulgatori te kao sastojci u proizvodnji sapuna, deterdženata i stočne hrane (Biermann i sur., 2021). Prema dobivenim rezultatima opisanim u poglavlju 4.4.3., vidljivo je da se proizvedeni sirovi liofilizirani pripravak TLL može koristiti u reakciji hidrolize esterske veze. Međutim, da bi se ispitala mogućnost primjene TLL u hidrolizi drugih supstrata, provedena je hidroliza 7 različitih ulja korištenih kao modelnih supstrata za TLL, a rezultati su prikazani grafički na **Slici 29**.





**Slika 29.** Hidroliza različitih vrsta ulja pri optimalnim reakcijskim uvjetima ( $w_{ulje} = 37,69\%$ ,  $w_{enzim} = 7\%$ ,  $pH = 7,31$ ,  $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) pomoću sirovog liofiliziranog pripravka lipaze tijekom 96 h

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da proizvedena TLL pokazuje široku supstratnu specifičnost budući da je za 5 od 7 testiranih ulja (hladno prešano suncokretovo ulje, omegol ulje, hladno prešano ulje konoplje, ekstra djevičansko maslinovo ulje i djevičansko bučino ulje) došlo do konverzije triacilglicerola za više od 40%. Najveća konverzija triacilglicerola zabilježena je nakon 72 h hidrolize primjenom omegol ulja ( $56,74 \pm 0,32\%$ ) i hladno prešanog ulja konoplje ( $56,72 \pm 0,53\%$ ). Najniža konverzija zabilježena je primjenom rafiniranog kokosovog ulja ( $11,52 \pm 1,77\%$  nakon 72h).

Kinetika hidrolize esterske veze u molekuli triacilglicerola u ovisnosti je o biokemijskim karakteristikama enzima te o strukturi aktivnog mjesta lipaze. Lipaza iz *T. lanuginosus* je amfifilna molekula koja u svojoj strukturi ima hidrofobni polipeptidni lanac pored aktivnog mjesta. Reakcija hidrolize odvija se u vodenom mediju što rezultira "zatvorenom konformacijom" TLL, odnosno hidrofobni polipeptidni lanac smješten je iznad aktivnog mjesta lipaze. U prisutnosti lipofilne molekule poput triacilglicerola, dolazi do konformacijske promjene hidrofobnog polipeptidnog lanca čime lipaza prelazi u "otvorenu konformaciju" i započinje katalitički ciklus (Brzozowski i sur.,

2000; Skjold-Jørgensen i sur., 2014). Odnosno, kinetika reakcije u ovisnosti je o svojstvima međufazne površine između enzima u hidrofilnoj fazi i strukturi triacilglicerola u lipofilnoj fazi što je ranije potvrđeno u ovom istraživanju prilikom optimiranja testa za mjerenje hidrolitičke aktivnosti TLL i modeliranja hidrolize *p*NP-palmitata (poglavlje 4.1.6.).

Između ostalog, reakcija hidrolize ulja katalizirana je sirovim liofiliziranim enzimskim pripravkom. Tijekom liofilizacije dolazi do koncentriranja svih ekstraktibilnih komponenti iz biološki obrađene bučine pogače kao i produkata nastalih tijekom rasta i metaboličke aktivnosti *T. lanuginosus*. Navedene komponente također mogu utjecati na stabilnost međufazne površine tijekom reakcije hidrolize ulja, te na samu kinetiku reakcije. Osim kontaminanata prisutnih u sirovom enzimskom pripravku, prirodno prisutni negliceridni sastojci korištenih ulja (voskovi, fitosteroli, tokoferoli, pigmenti, fenolne kiseline) (Rezig i sur., 2012) mogu imati utjecaj na stabilnost i formiranje međufazne površine.

Osim biokemijskih svojstava lipaze (poput hidrofobnog polipeptidnog lanca lokaliziranog iznad aktivnog mjesta lipaze) i stabilnosti međufazne površine na kojoj dolazi do reakcije, kinetika hidrolize ulja u izravnoj je ovisnosti o kemijskoj strukturi triacilglicerola. Enzim TLL pokazuje selektivnost prema određenoj vrsti triacilglicerola s obzirom na duljinu ugljikovodičnog lanca (broj ugljikovih atoma), broju i položaju dvostrukih veza na ugljikovodičnom lancu te položaju pojedine masne kiseline na gliceridnom ostatku. Navedene činjenice afirmiraju dobivene eksperimentalne rezultate prema kojima je jasno da TLL pokazuje veći afinitet prema hidrolizi određenih ulja (hladno prešano suncokretovo ulje, omegol ulje, hladno prešano ulje konoplje). U istraživanju kojega su proveli Akanbi i sur. (2013) dokazana je visoka selektivnost lipaze iz *T. lanuginosus* prema esencijalnim visokolančanim omega-3 masnim kiselinama (dokosaheksaenoična kiselina (DHA) i eikosapentaenoična kiselina (EPA)) tijekom hidrolize ribljeg ulja. U navedenom istraživanju, tijekom hidrolize ribljeg ulja najprije je došlo do oslobađanja masnih kiselina s manjim brojem ugljikovih atoma poput miristinske (C14:0), palmitinske (C16:0), palmitoleinske kiseline (C16:1 n-7) i oleinske (C18:1 n-9) kiseline. Nakon što je zabilježena konverzija triacilglicerola ribljeg ulja za oko 25%, došlo je do hidrolize EPA (C20:5 n-3). U nastavku hidrolize do konverzije ulja od oko 60% došlo je do potpune hidrolize EPA, uz istovremeno koncentriranje DHA (C20:6 n-3) kao monoacilglicerola. Ovi rezultati pokazuju da se EPA i DHA mogu razdvojiti i koncentrirati djelomičnom i selektivnom hidrolizom ribljeg ulja uz separaciju oslobođenih neesencijalnih srednjelančanih masnih kiselina. RSM optimizacijom reakcijskih uvjeta selektivne hidrolize ribljeg ulja pomoću TLL, Sun i sur. (2023) proveli su 55%-tnu konverziju triacilglicerola ulja do glicerida zasićenih s esencijalnim visokolančanim omega-3 masnim kiselinama EPA i DHA. Iz dobivenih



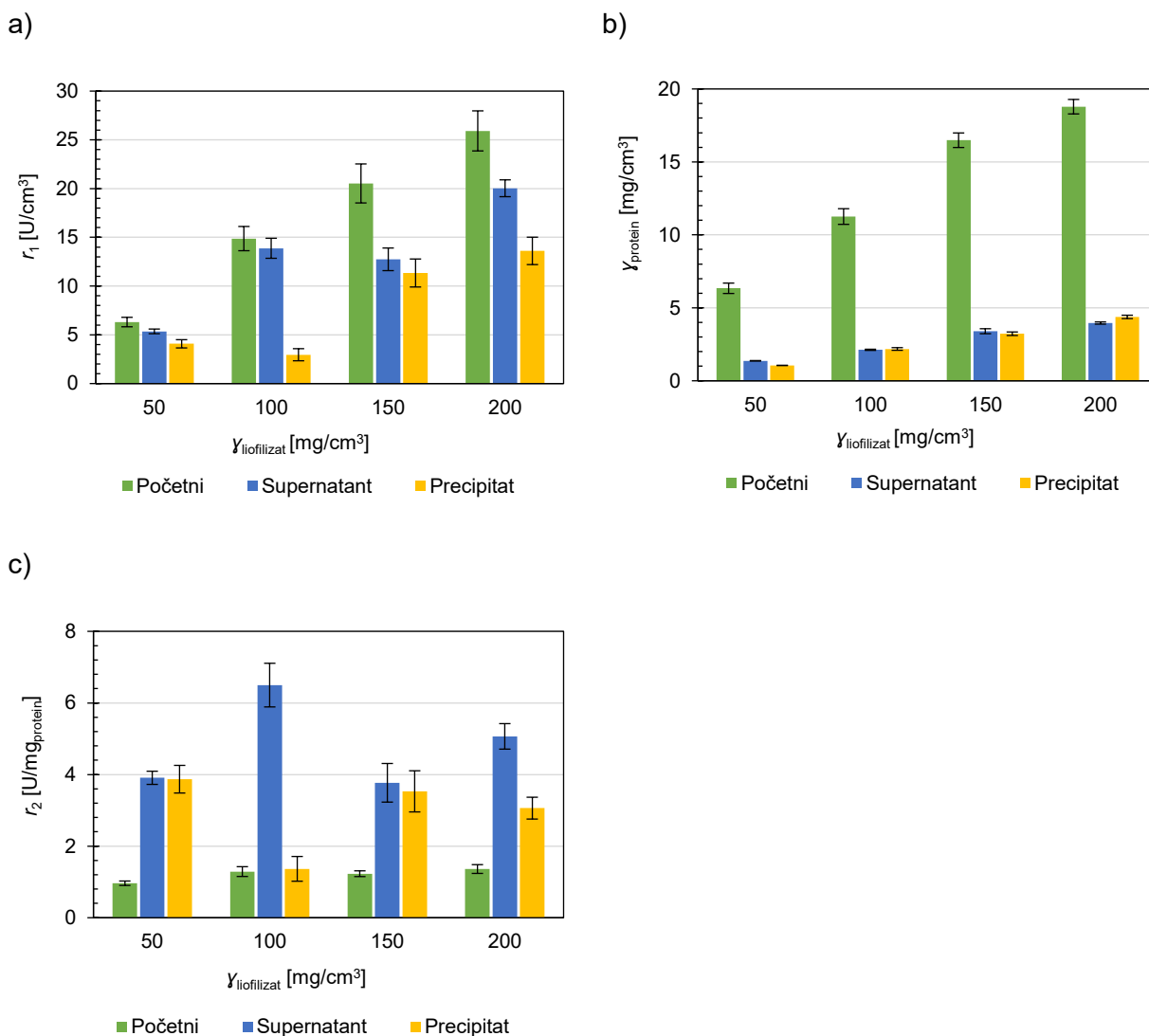
rezultata eksperimentalnog istraživanja te prema literaturnim podacima, vidljivo je da je primjenom sirovog liofiliziranog enzimskog pripravka moguće provesti djelomičnu hidrolizu različitih vrsta ulja što značajno doprinosi razvoju daljnjeg opsega istraživanja u proizvodnji pojedinačnih produkata hidrolize ulja.

## **4.5. REZULTATI DJELOMIČNOG PROČIŠĆAVANJA SIROVOG LIOFILIZIRANOG ENZIMSKOG PREPARATA**

Tijekom optimizacije procesa hidrolize ulja korišten je sirovi liofilizirani enzimski preparat. Maseni udio liofilizata apliciran u reakcijsku smjesu, s obzirom na ukupnu masu dodane vode (pufera) i ulja, iznosio je 7%. Odnosno, pripremljen je enzimski preparat u koncentraciji od 112,33 mg/cm<sup>3</sup> otapanjem 0,1685 g liofilizata u 1,5 g pufera (ekvivalent 1,5 cm<sup>3</sup> pufera). Masena koncentracija proteina u enzimskom preparatu izmjerena Bradfordičinom metodom iznosila je 9,28 mg/cm<sup>3</sup>. Uzevši u obzir masenu koncentraciju proteina te masu liofilizata korištenog za pripremu enzimskog pripravka u 1,5 cm<sup>3</sup> pufera, izračunata koncentracija proteina po gramu liofilizata iznosila je 82,6113 mg/g<sub>lio</sub>filizat. Prema dobivenim rezultatima, može se zaključiti da proteini čine 8,26% ukupne mase liofilizata. Iz navedenog razloga provedeno je pročišćavanje TLL precipitacijom proteina pomoći soli (amonijev sulfat) i organskog otapala (aceton).

### **4.5.1. Rezultati precipitacije lipaze pomoću amonijeva sulfata**

Prema podacima dostupnim u literaturi, precipitacija lipaze iz enzimskih pripravaka dobivenih iz klijajućih sjemenki, bakterija (*Pseudomonas* sp.) i gljiva (*Aspergillus* sp., *Penicillium chrysogenum* i *Thermomyces lanuginosus*) provedena je uz zasićenje amonijevim sulfatom od 70% (Shafei i Allam, 2010; Tišma i sur., 2019; Al-Haidari i sur., 2020; Jamilu i sur., 2022; Ali i sur., 2023; Ezenwelu i sur., 2022). Iz navedenog razloga, u ovom istraživanju za precipitaciju lipaze iz sirovog liofiliziranog enzimskog preparata korišteno je zasićenje amonijevim sulfatom od 70%. Nadalje, ispitan je utjecaj početne masene koncentracije liofilizata (50 – 200 mg/cm<sup>3</sup>) na precipitaciju TLL. Volumna aktivnost lipaze, masena koncentracija proteina te specifična aktivnost lipaze izmjerena je u početnom uzorku (liofilizat otopljen u vodi bez dodatka soli), u supernatantu te u rekonstituiranom precipitatu. Dobiveni rezultati prikazani su grafički (**Slika 30 a – c**).



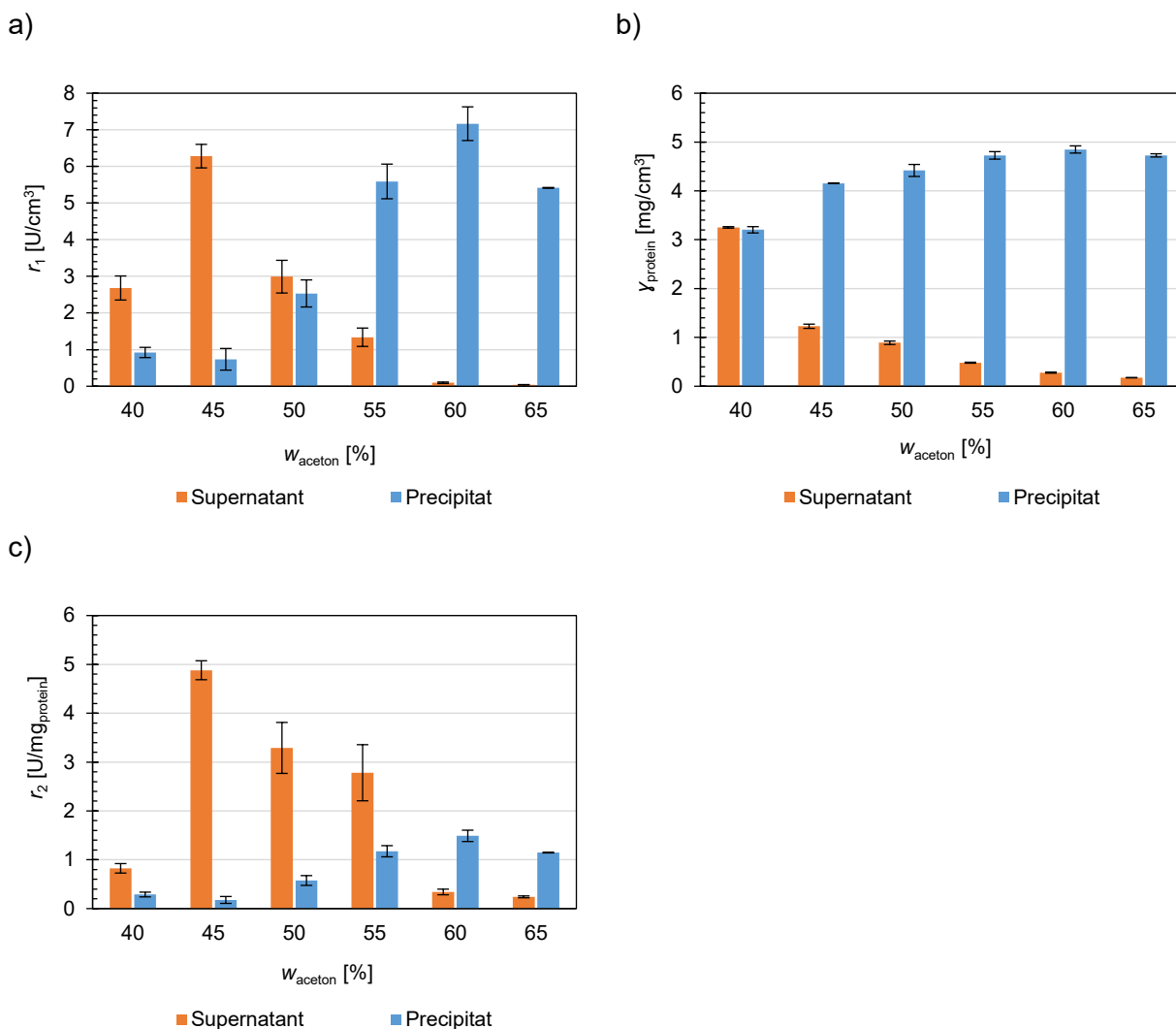
**Slika 30.** Rezultati mjerenja volumne aktivnosti lipaze (a), masene koncentracije proteina (b) i specifične aktivnosti lipaze (c) u supernatantu i precipitatu tijekom pročišćavanja lipaze iz različitih početnih koncentracija liofilizata primjenom amonijeva sulfata

Prema rezultatima mjerenja volumne aktivnosti TLL (**Slika 30a**) vidljivo je da volumna aktivnost rekonstituiranog precipitata nije bila veća (ili ista) volumnoj aktivnosti početnog uzorka. Prema tome, zaključeno je da početna masa liofilizata u ispitanom području ne utječe na separaciju TLL u precipitat. Uzevši u razmatranje dobivene rezultate, perfektuirano je da primjenom amonijeva sulfata u zasićenju od 70% nije dostatno za iscrpnu precipitaciju TLL, što je potvrđeno mjerenjem aktivnost TLL u supernatantu. Rezultati analize masene koncentracije proteina u uzorcima (**Slika 30b**) kulminiraju zaključkom da primjenom amonijeva sulfata u zasićenju od 70% dolazi do precipitacije proteina. Međutim, neovisno o početnoj masenoj koncentraciji liofilizata, masena

koncentracija proteina bila je istovjetna u supernatantu i precipitatu. Uzevši u obzir dobivene rezultate analize specifične aktivnosti lipaze (**Slika 30c**) vidljivo je da je primjenom amonijeva sulfata za postupak pročišćavanja i precipitacije proteina došlo do povećanja specifične aktivnosti u supernatantu i precipitatu, usporedivši rezultate dobivene mjerenjem specifične aktivnosti TLL u početnom uzorku pripremljenim u demineraliziranoj vodi, iz čega se može zaključiti da je primjenom amonijeva sulfata moguće provesti pročišćavanje lipaze. Iako je najveća izmjerena specifična aktivnost zabilježena primjenom enzimskog preparata početne masene koncentracije liofilizata od  $100 \text{ mg/cm}^3$ , aktivnost TLL u navedenom slučaju zabilježena je u supernatantu, a ne u precipitatu. Dobiveni rezultati impliciraju činjenicu da primjenom amonijeva sulfata u zasićenju od 70% i početne koncentracije liofilizata od  $100 \text{ mg/cm}^3$  značajno utječe na diferencijaciju lipaze od ostalih kontaminirajućih proteina. Međutim, dobiveni supernatant sadrži kontaminante koji se ne mogu taložiti uz dodatak amonijeva sulfata. Nadalje, da bi se provelo pročišćavanje lipaze primjenom  $1 \text{ dm}^3$  70%-tne vodene otopine amonijeva sulfata (pripremljena otapanjem 379,24 g soli), bilo bi potrebno provesti naknadno pročišćavanje i uklanjanje velike količine amonijeva sulfata. Iz navedenog razloga postupak pročišćavanja TLL precipitacijom pomoću amonijeva sulfata isključen je iz daljnjeg istraživanja.

#### **4.5.2. Rezultati precipitacije lipaze pomoću acetona**

Primjenom organskih otapala, poput acetona, provedeno je pročišćavanje lipaze nakon fermentacije uzgojem različitih mikroorganizama poput *A. niger*, *B. subtilis* i *P. stutzeri* (Cao i sur., 2012; Shah i Bhatt, 2012; Chen i sur., 2019). Osim toga, primjenom acetona provedena je precipitacija lipaze iz mikroorganizama *C. antarctica* i *T. lanuginosus* u svrhu imobilizacije enzima (Prabhavathi Devi i sur., 2009). Budući da primjenom acetona dolazi do precipitacije lipaze, te pritom nije zabilježena inhibicija enzima, u ovom istraživanju istražena je mogućnost precipitacije i pročišćavanja lipaze iz sirovog liofiliziranog preparata enzima posredstvom acetona u različitim volumnim udjelima. Rezultati mjerenja volumne aktivnosti lipaze, masene koncentracije proteina te specifične aktivnosti lipaze u supernatantu te u rekonstituiranom precipitatu prikazani su grafički (**Slika 31 a – c**).



**Slika 31.** Rezultati mjerenja volumne aktivnosti lipaze (a), masene koncentracije proteina (b) i specifične aktivnosti lipaze (c) u supernatantu i precipitatu tijekom pročišćavanja lipaze precipitacijom primjenom različitih volumnih udjela acetona

Prema dobivenim rezultatima mjerenja volumne aktivnosti TLL tijekom postupka precipitacije pomoću acetona (**Slika 31a**) vidljivo je da povećanjem volumnog udjela acetona do 45% u smjesi rezultira povećanjem volumne aktivnosti TLL u supernatantu. Daljnjim povećanjem volumnog udjela acetona dolazi do redukcije volumne aktivnosti TLL u supernatantu, uz istovremeno povećanje volumne aktivnosti u precipitatu. Prema rezultatima vidljivo je da je primjenom acetona moguća separacija lipaze iz supernatanta u precipitatu povećanjem volumnog udjela acetona do 60% (v/v). Daljnjim povećanjem volumnog udjela acetona u smjesi dolazi do redukcije volumne aktivnosti TLL. Slični rezultati zabilježeni su tijekom pročišćavanja lipaze proizvedene uzgojem

*A. niger*. Prema publiciranim rezultatima, povećanje omjera aceton:sirovi ekstrakt lipaze do 2,5:1 (71,33%, v/v) rezultira povećanjem volumne aktivnosti i koncentracije lipaze u precipitatu (Chen i sur., 2019). Mjerenjem masene koncentracije proteina u uzorcima (**Slika 31b**) vidljivo je da je pri volumnom udjelu acetona od 40% izmjerena podjednaka masena koncentracija proteina u supernatantu ( $3,25 \text{ mg/cm}^3$ ) i u precipitatu ( $3,20 \text{ mg/cm}^3$ ). Povećanjem koncentracije acetona u smjesi rezultira značajnom precipitacijom proteina, te je izmjerena masena koncentracija proteina od  $0,28 \text{ mg/cm}^3$  u supernatantu i  $4,85 \text{ mg/cm}^3$  u precipitatu pri volumnom udjelu acetona od 60%. Slični rezultati zabilježeni su tijekom precipitacije lipaze i proteina u istraživanju kojeg su proveli Hsu i Tsai (2001). Prema publiciranim rezultatima, dodatak acetona u volumnom udjelu od 41,18% rezultiralo je precipitacijom proteina za 50%. Povećanjem volumnog udjela acetona do 60%, u supernatantu zaostalo je 13,8% početne koncentracije proteina, odnosno precipitirano je 86,2% proteina. S obzirom na izmjerenu volumnu aktivnost lipaze i masenu koncentraciju proteina u uzorcima, izračunata je specifična aktivnost TLL (**Slika 31c**). Najveća specifična aktivnost zabilježena je u supernatantu uz dodatak 45% volumnog udjela acetona. Nadalje, najveća specifična aktivnost TLL u precipitatu izmjerena je primjenom acetona u volumnom udjelu od 60%, ali za 3,26 puta manja nego u supernatantu s 45% volumnog udjela acetona. Navedeni rezultati proizlaze iz činjenice da dodatak 45% volumnog udjela acetona rezultira značajnom precipitacijom kontaminirajućih proteina, dok u supernatantu zaostaje enzim TLL. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je primjenom acetona moguća selektivna separacija TLL od kontaminirajućih proteina te je u idućem poglavlju predložen i objašnjen postupak precipitacije TLL dodatkom acetona u dva stupnja.

#### 4.5.3. Rezultati pročišćavanja lipaze postupnom precipitacijom pomoću acetona

Kao što je specificirano u prethodnom poglavlju, koncentracija proteina izmjerena Bradfordičinom metodom te izračunata na masu korištenog liofilizata iznosi  $82,6113 \text{ mg/g}_{\text{liofilizat}}$ . Prema tome, za povećanje aktivnosti lipaze u enzimskom pripravku nije bilo dovoljno provesti koncentriranje enzima liofilizacijom nego odabrati metodu koja omogućuje selektivnu diferencijaciju lipaze od kontaminirajućih proteina te ostalih u vodi ekstraktibilnih komponenti. U prvom dijelu istraživanja pročišćavanja lipaze ispitana je precipitacija TLL pomoću amonijeva sulfata. Amonijev sulfat odabran je zbog kemijskih karakteristika koje omogućuju selektivnu precipitaciju proteina od ostalih kontaminanata prisutnih u ekstraktu (primjerice fenolnih spojeva, topivih oligosaharida, pigmenata). Prema rezultatima (poglavlje 4.5.1.) zabilježena je precipitacija proteina i lipaze. Međutim, primjena amonijeva sulfata nije se pokazala kao pogodna metoda za povećanje

volumne aktivnosti TLL u precipitatu. Iz navedenog razloga, provedena je precipitacija lipaze pomoću acetona. Prema dobivenim rezultatima (poglavlje 4.5.2.), vidljivo je da aceton u volumnom udjelu od 60% (v/v) značajno utječe na precipitaciju lipaze ali i svih prisutnih kontaminirajućih proteina. Osim proteina, primjena acetona, kao neselektivne metode za pročišćavanje proteina iz sirovog ekstrakta, rezultirala je precipitacijom prisutnih oligosaharida iz ekstrakta. Međutim, postupnim povećanjem volumnog udjela acetona u sirovom enzimskom preparatu moguća je selektivna precipitacija kontaminirajućih proteina i oligosaharida od enzima lipaze. Rezultati predložene metode prikazani su u **Tablici 26**. Stupanj pročišćavanja i prinos izračunati su u odnosu na enzimski ekstrakt dobiven nakon ekstrakcije biološki obrađene bučine pogače.

**Tablica 26.** Sažeti rezultati pročišćavanja lipaze postupnom precipitacijom pomoću acetonom

Uzorak	$V$ [cm <sup>3</sup> ]	Ukupna aktivnost [U]	Ukupni proteini [mg]	$r_1$ [U/cm <sup>3</sup> ]	$\gamma_{\text{protein}}$ [mg/cm <sup>3</sup> ]	$r_2$ [U/mg protein]	$F$ [-]	Prinos [%]
Ekstrakt	42,5	51	75	1,19	1,76	0,68	1,00	100,00
Liofilizat	11	148	117	13,48	10,67	1,26	1,86	292,56
Supernatant	20	260	38	12,98	1,89	6,88	10,12	512,32
Precipitat	1,5	457	62	304,87	41,11	7,42	10,91	902,15

Nakon biološke obrade bučine pogače, provedena je ekstrakcija lipaze u demineraliziranoj vodi te je izmjerena volumna aktivnost TLL od 1,19 U/cm<sup>3</sup> i masena koncentracija proteina 1,76 mg/cm<sup>3</sup>. Za postupak pročišćavanja lipaze korišteno je 2 g liofilizata. Da bi se dobila potrebna masa liofilizata za postupak pročišćavanja, liofilizirano je 42,5 cm<sup>3</sup> ekstrakta lipaze. Nakon liofilizacije, 2 g liofilizata otopljeno je u 11 cm<sup>3</sup> demineralizirane vode. U pripremljenom uzorku izmjerena je volumna aktivnosti TLL (13,48 U/cm<sup>3</sup>) i masena koncentracija proteina (10,67 mg/cm<sup>3</sup>). Povećanje volumne aktivnosti TLL i masene koncentracije proteina u odnosu na početni ekstrakt lipaze posljedica je koncentriranja enzimskog pripravka sušenjem zamrzavanjem. Međutim, u ovom koraku pročišćavanja zabilježen je porast specifične aktivnosti TLL sa 0,68 U/mg<sub>protein</sub> na 1,26 U/mg<sub>protein</sub> što je rezultiralo povećanjem faktora pročišćavanja ( $F = 1,86$ ).

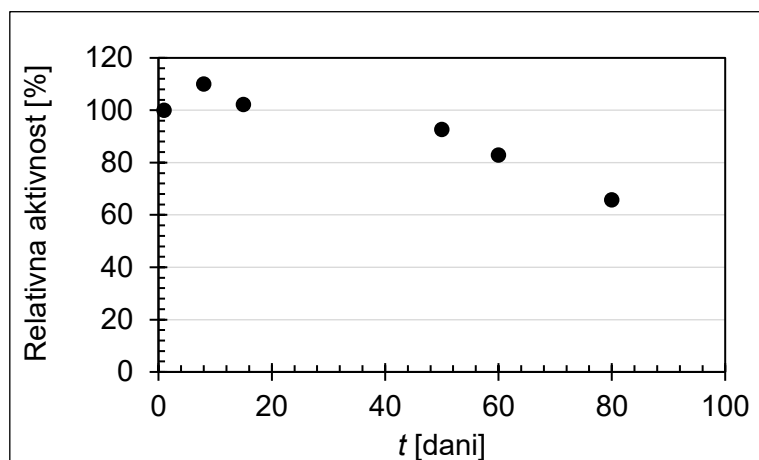
Navedeno povećanje specifične aktivnosti TLL povezano je s povećanjem aktivnosti i stabilnosti enzima tijekom liofilizacije. Podaci dobiveni nakon FT-IR analize liofilizirane lipaze iz *P. cepacia* i *C. antarctica* ukazuju na činjenicu da tijekom procesa sušenja zamrzavanjem dolazi do promjene u sekundarnoj strukturi lipaze. Udio  $\alpha$ -uzvojnice u strukturi lipaze se smanjuje, dok istovremeno dolazi do povećanja udjela  $\beta$ -nabrane ploče. Također, istraživanja su pokazala da su navedene konformacijske modifikacije proteina uzrokovane liofilizacijom reverzibilne u slučaju kad se liofilizirani prah rekonstituira u vodi, dok su ireverzibilne ako se liofilizirani prah lipaze suspendira u organskom otapalu (Secundo i Carrea, 2002). Nadalje, istraživanja su pokazala da dodatak određenih spojeva mogu povećati aktivnosti i stabilnost lipaze tijekom procesa liofilizacije. Primjerice, dodatak kalijeva klorida i etera (18-crown-6) prije liofilizacije rezultiralo je povećanjem aktivnosti lipaze iz *Humicola lanuginosa* (današnji naziv: *T. lanuginosus*) do 46 puta, usporedno s provedbom liofilizacije bez dodatka navedenih spojeva, dok je stabilnost lipaze tijekom procesa liofilizacije povećana uz dodatak trehaloze (Kreilgaard i sur., 1999; Persson i sur., 2002). Drugi krioprotektori i lioprotektori, kao što su šećeri i ciklodekstrini, mogu spriječiti strukturalna oštećenja lipaza tijekom procesa liofilizacije. Učinak različitih aditiva na aktivnost i stabilnost lipaze tijekom liofilizacije određen je vrstom i koncentracijom aditiva (poput hidrolizata proteina sirutke, amonijeva sulfata, maltodekstrina, glicerola, saharoze, trehaloze, manitola), vremenom liofilizacije, udjelom vode, itd. (Secundo i Carrea, 2005; Shu i sur., 2010; Darvishi i sur., 2012; Jasińska i sur., 2021).

Nadalje, u otopljeni liofilizat dodano je 9 cm<sup>3</sup> acetona te je proveden prvi stupanj pročišćavanja precipitacijom kontaminirajućih proteina i oligosaharida (24h, 4 °C). Nakon precipitacije i centrifugiranja, volumna aktivnost TLL i masena koncentracija proteina u dobivenom supernatantu iznosila je 12,98 U/cm<sup>3</sup> i 1,89 mg/cm<sup>3</sup>. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je u prvom stupnju pročišćavanja došlo do diferencijacije lipaze od kontaminirajućih proteina budući da se masa ukupnih proteina smanjila sa 117 mg na 38 mg. Odnosno, u prvom stupnju pročišćavanja došlo je do precipitacije kontaminirajućih proteina (i ugljikohidrata), što je rezultiralo povećanjem specifične aktivnosti TLL u dobivenom supernatantu na 6,88 U/mg<sub>protein</sub> uz faktor pročišćavanja 10,12.

U drugom stupnju pročišćavanja, u 20 cm<sup>3</sup> supernatanta (prikupljenog u prvom stupnju pročišćavanja) dodano je 20 cm<sup>3</sup> acetona te je provedena precipitacija TLL i zaostalih kontaminirajućih proteina (24h, 4 °C). Nakon pročišćavanja, precipitat je rekonstituiran u TRIS-HCl puferu (50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH = 9). Volumna aktivnost lipaze u pročišćenom pripravku enzima iznosila je 304,87 U/cm<sup>3</sup>. Specifična aktivnost lipaze (7,42 U/mg<sub>protein</sub>) i faktor pročišćavanja (10,91) nisu

se značajno promijenili u odnosu na mjerenja provedena uzorkovanjem supernatanta dobivenog u prvom stupnju pročišćavanja. Iz navedenog, zaključeno je da prvi stupanj pročišćavanja rezultira kompletnom diferencijacijom TLL od kontaminanata u supernatantu, čime je uslijedila precipitacija i koncentriranje enzima u precipitatu postupnim povećanjem volumnog udjela acetona. U konačnici, volumna aktivnost pročišćenog enzimskog preparata bila je veća za 256,19 puta u odnosu na volumnu aktivnost TLL u početnom ekstraktu što je rezultiralo prinosom pročišćavanja za 902,15%.

Također, ispitana je stabilnost djelomično pročišćene TLL tijekom skladištenja na 4 °C u trajanju od 80 dana. Prema dobivenim rezultatima (**Slika 32**) zabilježena je postupna redukcija aktivnosti TLL. Nakon 80 dana skladištenja, relativna aktivnost TLL iznosila je 65,79%.



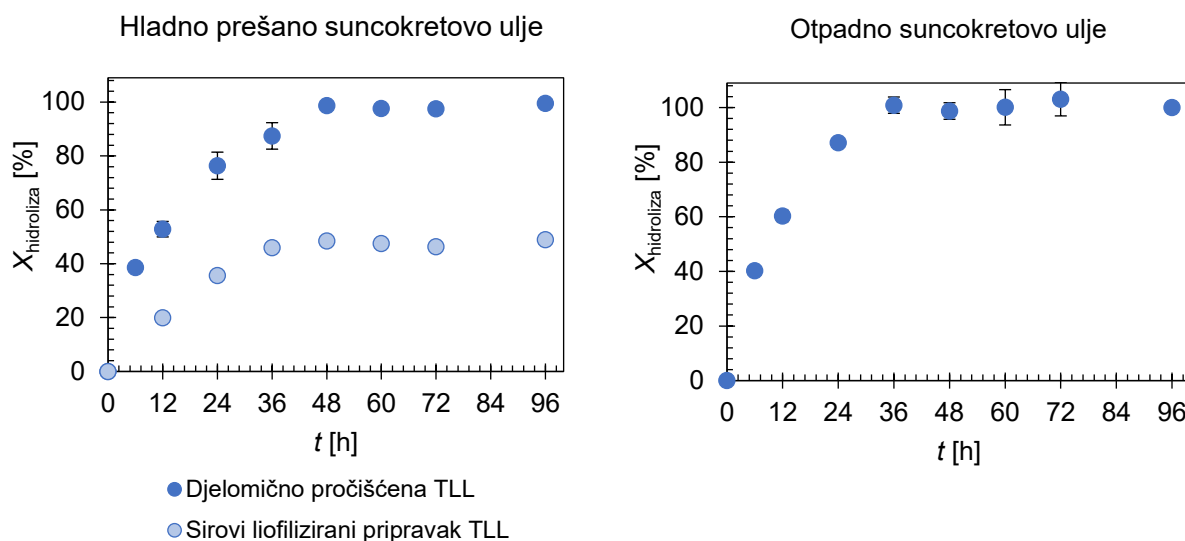
**Slika 32.** Stabilnost djelomično pročišćenog liofiliziranog ekstrakta lipaze tijekom skladištenja pri temperaturi od 4 °C

#### 4.5.4. Rezultati hidrolize ulja katalizirane pomoću djelomično pročišćene lipaze

Nakon djelomičnog pročišćavanja sirovog liofiliziranog pripravka TLL precipitacijom pomoću acetona u dva stupnja provedena je hidroliza hladno prešanog suncokretovog ulja i otpadnog suncokretovog ulja. Rezultati su prikazani na **Slici 33**. Prema rezultatima dobivenim hidrolizom hladno prešanog suncokretovog ulja maksimalna konverzija triacilglicerola od 98,71% zabilježena je nakon 48 h hidrolize. Na grafičkom prikazu uspoređeni su rezultati dobiveni nakon provedene hidrolize hladno prešanog suncokretovog ulja pomoću sirovog i djelomično pročišćenog liofiliziranog pripravka TLL. Slijedom dobivenih usporednih rezultata, vidljivo je da primjenom djelomično pročišćene TLL zabilježena veća konverzija triacilglicerola kao posljedica veće volumne i specifične aktivnosti djelomično pročišćene TLL. Nadalje, tijekom pročišćavanja sirovog

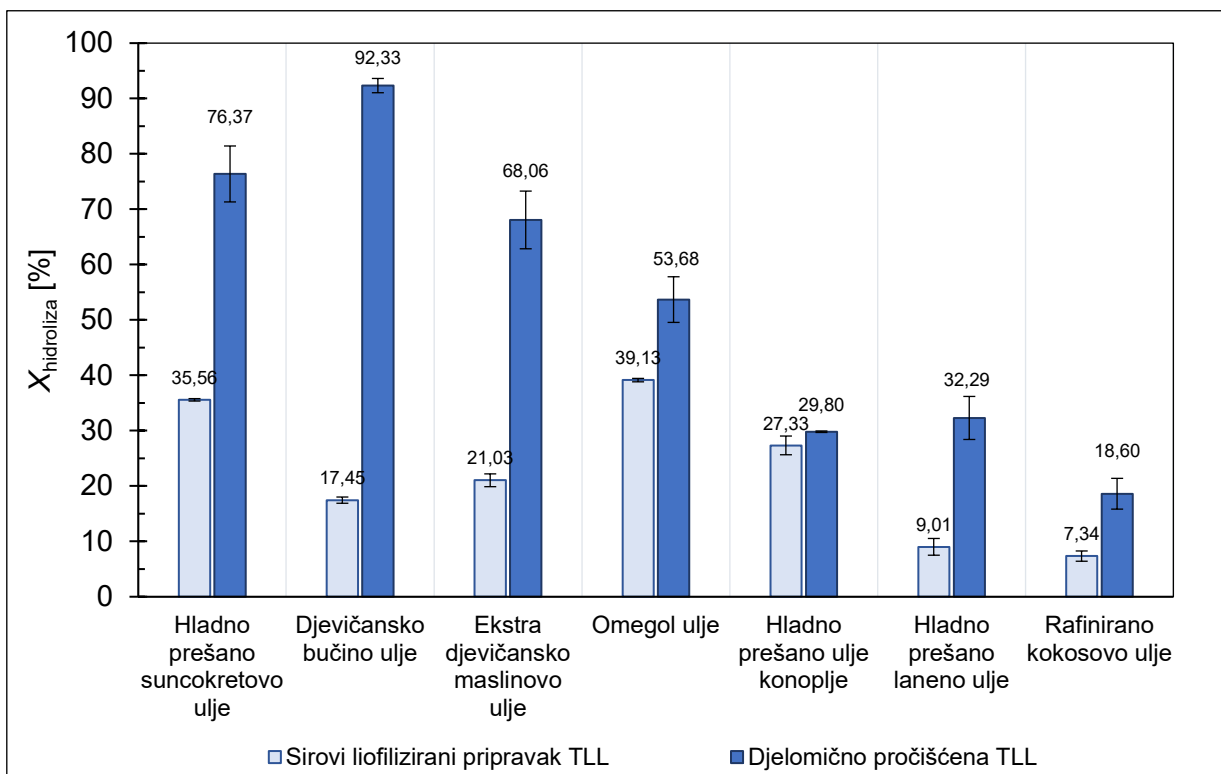


liofiliziranog pripravka TLL pomoću acetona došlo je do precipitacije kontaminirajućih proteina i ugljikohidrata u prvom stupnju pročišćavanja, dok su polifenolni spojevi i pigmenti zaostali u supernatantu nakon drugog stupnja pročišćavanja (pogledati poglavlje 4.5.5.). Sukladno navedenom, eliminacija kontaminirajućih spojeva iz enzimskog pripravka rezultira formiranjem stabilnije međufazne površine između vodene faze u kojoj je otopljen enzim te supstrata (ulja). Uklanjanjem kontaminanata poboljšana je prijenos mase tijekom reakcije hidrolize što je rezultiralo većom reakcijskom brzinom i većom konverzijom tijekom hidrolize ulja. Nadalje, rezultati dobiveni nakon provedene hidrolize otpadnog suncokretovog ulja pokazali su mogućnost primjene djelomično pročišćene TLL u valorizaciji otpadnih ulja, s kompletnom konverzijom triacilglicerola (100%, 36h), što povećava doprinos predloženog koncepta biorafinerije.



**Slika 33.** Hidroliza hladno prešano suncokretovog ulja i otpadnog suncokretovog ulja pomoću djelomično pročišćene TLL

U idućem koraku istraživanja, ispitan je potencijal biokatalitičke primjene djelomično pročišćene TLL u reakciji hidrolize različitih vrsta ulja kao modelnih supstrata za proizvedenu lipazu. Rezultati su prikazani na **Slici 34** kao usporedni prikaz konverzije ulja pomoću sirovog liofiliziranog pripravka TLL i djelomično pročišćene TLL nakon provedene hidrolize u trajanju od 24 sata.



**Slika 34.** Hidroliza različitih vrsta ulja pomoću nepročišćene i djelomično pročišćene TLL u trajanju od 24 h

U prethodno publiciranim rezultatima, ispitana je hidrolitička aktivnost imobiliziranih komercijalnih enzima lipaze iz različitih izvora: Novozyme 435 (lipaza iz *C. antarctica* B), Lipozyme RM IM (lipaza iz *R. miehei*) te Lipolase 100T (lipaza iz *T. lanuginosus*) u reakciji hidrolize suncokretovog ulja. Za pripremu reakcijske smjese korišteno je 1 g suncokretovog ulja, 2,5 g pufera (pH 7), 1,4 cm<sup>3</sup> heptana i 0,050 g imobilizirane lipaze. Najveća konverzija zabilježena je primjenom lipaze iz *T. lanuginosus* (85,3%) nakon 6 h reakcije (Gutiérrez-Ayesta i sur., 2007). Prema dobivenim rezultatima, vidljivo je da lipaza iz *T. lanuginosus* pokazuje veliku biokatalitičku aktivnost u reakciji hidrolize triacilglicerola. U istraživanju provedenom u ovom radu, nakon enzimske hidrolize modelnih supstrata u trajanju od 24 sata, vidljivo je da je primjenom djelomično pročišćene TLL došlo do povećanja konverzije triacilglicerola kod svih testiranih modelnih supstrata, uz najveću konverziju triacilglicerola hidrolizom djevičanskog bučinog ulja (92,33%).

Rezultati dobiveni nakon enzimske hidrolize hladno prešanog suncokretovog ulja primjenom djelomično pročišćene TLL pokazuju povećanje konverzije suncokretovog ulja do 76,37%. U istraživanju provedenog od Abdelmoez i sur. (2013) proveden je submerzni uzgoj *C. rugosa* ATCC 14830 s ciljem proizvodnje lipaze iskorištavanjem otpada industrije biljnih ulja. Proizvedena

nepročišćena lipaza korištena je u reakciji hidrolize suncokretovog ulja te je zabilježena maksimalna konverzija triacilglicerola od 39,5% nakon 24h hidrolize pri 39 °C. Slični rezultati zabilježeni su u ovom istraživanju primjenom nepročišćene lipaze uz konverziju suncokretovog ulja od 35,56 %.

Visoka konverzija triacilglicerola modelnih supstrata zabilježena je hidrolizom ekstra djevičanskog maslinovog ulja. Nakon pročišćavanja lipaze zabilježena je konverzija triacilglicerola od 68,06%. Song i sur. (2007) proveli su hidrolizu maslinovog ulja kataliziranu pomoću imobilizirane lipaze iz *C. rugosa*. Nakon 12 sati reakcije hidrolize, zabilježena je konverzija triacilglicerola za 50%. Povećanje konverzije triacilglicerola hidrolizom ulja (60%) zabilježeno je u slučaju kad je tijekom hidrolize korišteno organsko otapalo izooktan. Veća konverzija maslinovog ulja primjenom organskog otapala povezana je s manjom viskoznosti reakcijske smjese što je u konačnici utjecalo na prijenos mase te samim time i veću reakcijsku brzinu.

Niže konverzije triacilglicerola zabilježene su primjenom hladno prešanog ulja konoplje (29,80%), hladno prešanog lanenog ulja (32,29%) te rafiniranog kokosovog ulja (18,60%). Prema publiciranim rezultatima, visoka konverzija triacilglicerola iz ulja konoplje zabilježena je primjenom imobilizirane lipaze iz *P. cepacia* u protočno-kotlastom reaktoru. Nakon vremena zadržavanja supstrata pripremljenog u smjesi *tert*-butanol:voda od 38 minuta i volumnog protoka od 0,092 cm<sup>3</sup>/min zabilježena konverzija iznosila je 60% (Bavaro i sur., 2020). Prema rezultatima istraživanja provedenog od Nguyen i sur. (2018) nakon optimizacije reakcijskih uvjeta hidrolize kokosovog ulja maksimalna zabilježena konverzija triacilglicerola iznosila je 79,64% nakon 16 sati hidrolize katalizirane pomoću lipaze iz *C. rugosa*.

Uzevši u obzir dobivene rezultate u ovom istraživanju te usporedivši ih s literaturnim podacima konverzije različitih ulja pomoću komercijalne lipaze, konkluzivan ishod istraživanja sugerira mogućnost optimizacije procesa biotransformacija širokog spektra supstrata pomoću proizvedene lipaze s ciljem proizvodnje visokovrijednih produkata.

#### **4.5.5. Rezultati kemijske analize frakcija dobivenih tijekom pročišćavanja sirovog liofiliziranog enzimskog preparata**

Slijed pročišćavanja TLL iz sirovog liofiliziranog enzimskog pripravka postupnom precipitacijom posredstvom organskog otapala (acetona) kulminirao je separacijom dvije frakcije. Prva frakcija separirana je u obliku precipitata u prvom stupnju pročišćavanja. Druga frakcija predstavlja supernatant organskog otapala (acetona). Glavni cilj predložene metode bio je provesti

pročišćavanje proizvedene lipaze, a dodatne kemijske analize provedene su da bi se procijenila mogućnost valorizacije prve i druge frakcije s ciljem pročišćavanja TLL bez akumulacije i retencije otpada.

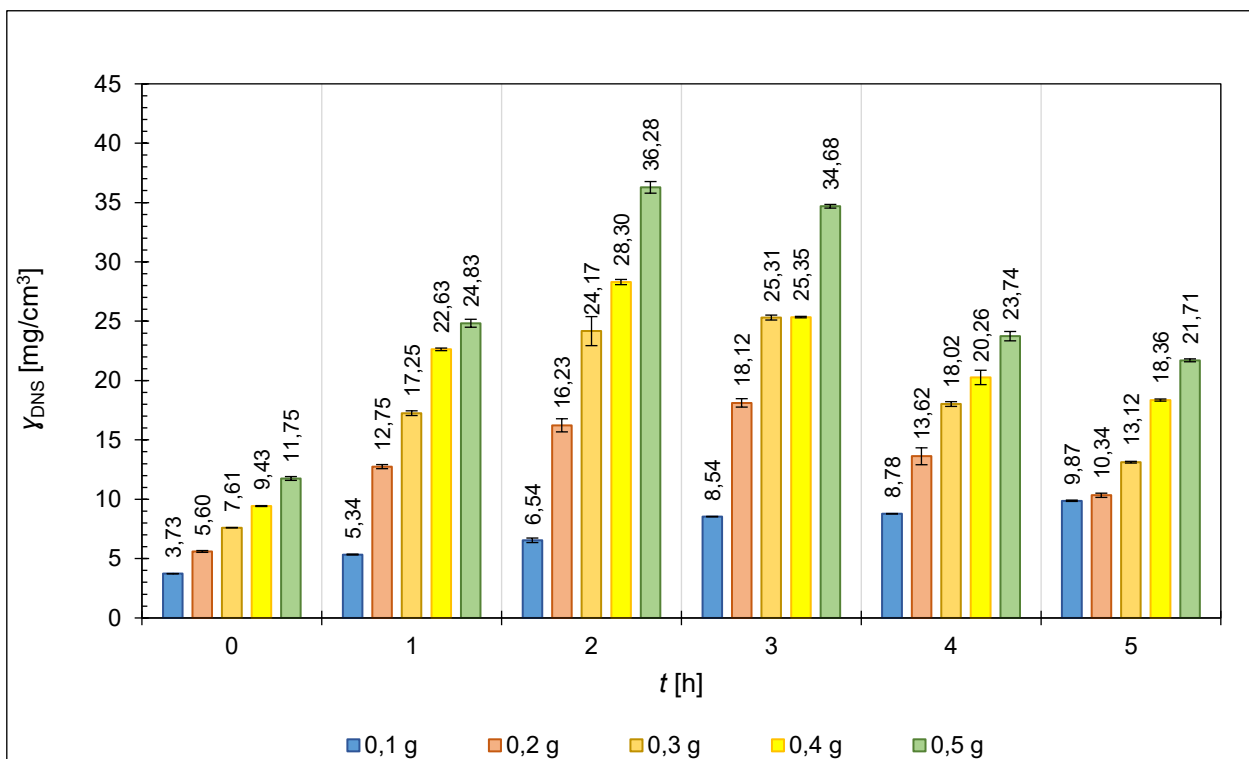
#### 4.5.5.1. Kemijska analiza prve frakcije (precipitata)

Provedba kruto-tekuće ekstrakcije TLL biološki obrađene bučine pogače rezultira ekstrakcijom lipaze te velikog broja drugih visokovrijednih (makro)molekula. Prema literaturnim podacima, bučine sjemenke sadrže veliki udio topivih proteina, aminokiselina, polifenola, tokoferola, fitosterola i mineralnih za koje je poznato da imaju funkciju u očuvanju zdravlja i prevenciji kroničnih bolesti kod ljudi (Dotto i Chacha, 2020). Istraživanje provedeno od Kushawaha i sur. (2016) argumentiralo je inhibicijski efekt vodenog ekstrakta sjemenki buče prema enzimima  $\alpha$ -amilaze (inhibicija enzima za  $46,03 \pm 1,37\%$ ,  $IC_{50} = 7,00 \pm 0,29 \text{ mg/cm}^3$ ) i  $\alpha$ -glukozidaze (inhibicija enzima za  $35,11 \pm 1,04\%$ ,  $IC_{50} = 8,11 \pm 0,36 \text{ mg/cm}^3$ ). Rezultat provedenih istraživanja ukazao je na potencijalnu primjenu vodenog ekstrakta sjemenki buče u kontroli postprandijalne hiperglikemije koja uzrokuje dijabetes melitus tipa 2. U istraživanju provedenog od grupe autora Song i sur. (2011) ispitana je mogućnost proizvodnje sirovog vodenog ekstrakta heteropolisaharida iz buče (Lady Godiva). Nakon provedene GC-MS i NIR analize, kvalificiran je kemijski sastav dobivenog heteropolisaharida molekulske mase od 10,1 kDa koji se u najvećem udjelu sastojao od 1,6-disupstituirane- $\alpha$ -galaktopiranozil jedinice (33,33%) sastavljene od monomernih jedinica L-fukoze, D-galaktoze, D-glukoze i D-manoze. Nadalje, u vodi topivi polisaharidi manje molekulske mase (3,5 kDa) izolirani su kao polimeri sastavljeni od ramnoze, glukoze, arabinoze, galaktoze i uronske kiseline (u masenom omjeru 1:1:4:6:15) te je afirmiran njihov inhibicijski efekt prema enzimima koji kataliziraju hidrolizu složenih ugljikohidrata tijekom probave. Osim toga, izolirani polisaharidi djelovali su inhibicijski prema DPPH i ABTS slobodnim radikalima (Li i sur., 2021). Štoviše, mogućnost pripreme oligosaharida niže molekulske mase kemijskom hidrolizom polisaharida iz pulpe buče (*Cucurbita moschata*) provedeno je u istraživanju grupe autora Du i sur. (2011). Prema rezultatima, analizirani jednostavni šećeri u dobivenim oligosaharidima su galaktoza (99,03%) i glukoza (0,97%). Proizvedeni oligosaharidi pokazali su rezistentnost tijekom simulacije probave te prema enzimskom djelovanju  $\alpha$ -amilaze. Značajna svojstva prebiotika proizvedeni oligosaharidi pokazali su tijekom *in-vitro* ispitivanja kao sposobnost stimuliranja rasta poželjnih laktobacila u probavnom traktu. Mogućnost precipitacije polisaharida pomoću acetona ranije je dokazana u provedenim istraživanjima (Abbou i sur., 2019). Također, precipitacija polisaharida gradijentnim povećanjem volumnog udjela organskog otapala

rezultira frakcioniranjem ugljikohidrata prema molekularnoj masi. Pri nižim koncentracijama organskog otapala, najprije dolazi do precipitacije ugljikohidrata veće molekularne mase (poput polisaharida i oligosaharida). Povećanjem udjela organskog otapala, dolazi do precipitacije jednostavnijih ugljikohidrata poput monosaharida i disaharida (Shi, 2016).

U eksperimentalnom istraživanju doktorskog rada, u prvom stupnju pročišćavanja sirovog liofiliziranog enzimskog preparata korišten je aceton u volumnom udjelu od 45% (v/v). Pročišćavanjem 2 g liofiliziranog enzimskog preparata dobiveno je  $0,8577 \pm 0,0392$  g precipitata. Analogno rezultatima, konstatirano je da prvi stupanj pročišćavanja TLL rezultira uklanjanju 43% kontaminirajućih spojeva izračunato na masu početnog liofilizata. Masena koncentracija proteina u precipitatu iznosila je  $4,16 \text{ mg/cm}^3$  (**Slika 31b**), odnosno masa proteina dobivena precipitacijom 2 g liofilizata iznosila je 0,0832 g. Prema rezultatima može se zaključiti da proteini čine samo 9,7% ukupne mase precipitata. Uzevši u obzir navedene činjenice pregleda literature u prethodnom poglavlju, iznesena premisa glasi da ostatak mase precipitata čine ugljikohidrati, odnosno složeni polisaharidi velike molekularne mase. Da bi se potvrdila navedena premisa te donio konkluzivan ishod istraživanja, provedena je kemijska hidroliza dobivenog precipitata uz analizu masene koncentracije (**Slika 35**) i masenog udjela (**Slika 36**) reducirajućih šećera u uzorcima prije i nakon hidrolize.

Kemijska hidroliza precipitata provedena je primjenom  $5 \text{ cm}^3$  sumporne kiseline ( $1 \text{ mol/dm}^3$ ) pri temperaturi od  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 5 h. Početna masa precipitata iznosila je od 0,1 do 0,5 g. Prema dobivenim rezultatima najveća masena koncentracija reducirajućih šećera dobivena je kemijskom hidrolizom 0,5 g liofilizata nakon 2 h reakcije te je iznosila  $36,28 \text{ mg/cm}^3$ . Odnosno, masa dobivenih reducirajućih šećera iznosila je 181,4 mg. U nastavku kemijske hidrolize zabilježena je redukcija masene koncentracije reducirajućih šećera kao posljedica njihove degradacije do razgradnih produkata (de Moura i sur., 2015).



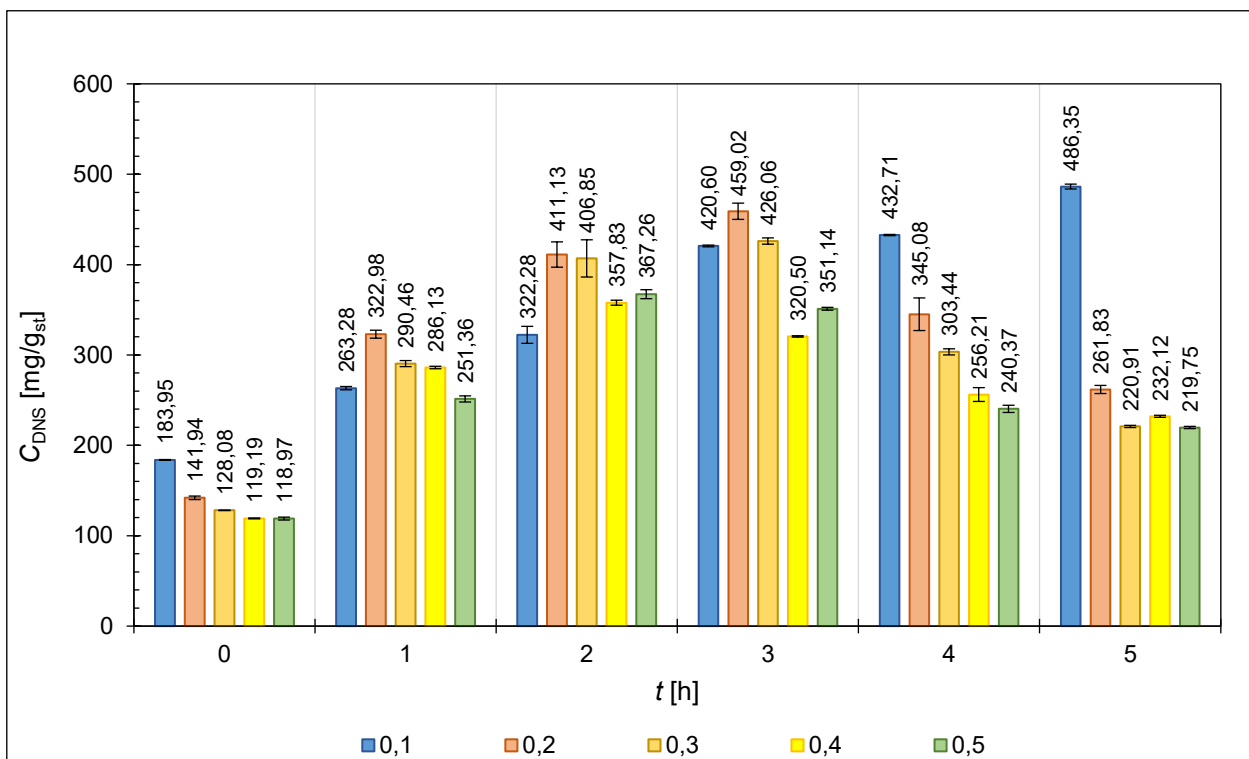
**Slika 35.** Masena koncentracija reducirajućih šećera izmjerena prije, tijekom i nakon kiseline hidrolize različite početne mase liofiliziranog precipitata dobivenog nakon prvog stupnja pročišćavanja lipaze postupnom precipitacijom pomoću acetona

Prema rezultatima prikazanih na **Slici 36**, prosječni maseni udio reducirajućih šećera u početnom uzorku prije enzimske hidrolize iznosio je  $138,42 \pm 27,11$  mg/g<sub>st</sub>. Najveći prinos reducirajućih šećera dobiven je kemijskom hidrolizom 0,1 g precipitata u trajanju od 5 sati te je iznosio 486,35 mg/g<sub>st</sub>, čime je potvrđeno da ugljikohidrati čine najmanje 48,64% mase dobivenog precipitata.

U istraživanju provedenog od grupe autora Świątek i sur. (2020) ispitan je utjecaj temperature na hidrolizu tri lignocelulozne sirovine (sječka bukve, sječke smreke i *Miscanthus x giganteus*). Tijekom hidrolize, mjerena je koncentracija šećera, furfurala i organskih kiselina. Rezultati istraživanja pokazali su da je povećanje temperature reakcije imalo pozitivan učinak na sintezu furfurala i organskih kiselina, posebno na hidroksimetilfurfural (HMF) i levulinske kiseline. Maksimalni maseni udio glukoze, ksiloze i manoze bio je u rasponu 70,7 – 148,0 mg/g<sub>st</sub>, 9,5 – 60,8 mg/g<sub>st</sub> i 0,0 – 17,6 mg/g<sub>st</sub> nakon provedene kiseline hidrolize navedenih sirovina u trajanju od 40 minuta pri 200 °C. Nadalje, optimizacijom reakcijskih uvjeta kiseline hidrolize slame (*Teff*) primjenom Box-Behnken eksperimentalnog dizajna (120 °C, 55 min, 4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

omjer kruto:tekuće = 1:20), maksimalni maseni udio reducirajućih šećera iznosio je 26,56 mg/g (Tesfaw i Tizazu, 2021). Zhou i sur. (2021) objavili su pregled nedavno objavljenih rezultata hidrolize različite lignocelulozne biomase pod različitim uvjetima primjenom sumporne kiseline. Prema pregledu literature, kiselinskom hidrolizom lignoceluloznih sirovina bilo je moguće proizvesti hidrolizate koji sadrže 25 mg/g – 111 mg/g glukoze i 53,3 mg/g – 256 mg/g ksiloze. Prema dobivenim rezultatima i usporedno s literaturom vidljivo je da visokovrijedni nusprodukt koji zaostaje tijekom pročišćavanja TLL predloženom metodom gradijentne precipitacije pomoću acetona, može se dodatno valorizirati s ciljem proizvodnje širokog spektra produkata.

Optimizacijom procesnih uvjeta kemijske hidrolize, dobiveni polisaharidni precipitat može se djelomično hidrolizirati u svrhu proizvodnje oligosaharida te rezistentnog prebiotika (Du i sur., 2011). Nadalje, moguća je kompletna hidroliza polisaharidnog precipitata do jednostavnijih ugljikohidrata poput monosaharida i disaharida. Dobiveni šećeri predstavljaju platformu za proizvodnju širokog spektra industrijski važnih produkata poput bioetanola, hidroksimetilfurfurala i levulinske kiseline (van Putten i sur., 2013; Aditiya i sur., 2016; Kang i sur., 2018). Iako kemijski katalizirana hidroliza polisaharida primjenom koncentriranih kiselina zahtjeva nižu procesnu temperaturu, glavni nedostatak navedene metode je složenost procesa separacije katalizatora od produkta te gubitak velike količine kiseline i šećera. S druge strane, primjenom razrijeđenih kiselina dolazi do manje potrošnje kemikalije, ali takav proces zahtijeva povišenu procesnu temperaturu s ciljem visokog stupanja konverzije supstrata. Samim time, moguća je razgradnja šećernih hidrolizata do nepoželjnih produkata (Zhou i sur., 2021). Štoviše, kiselinskom hidrolizom lignoceluloznih sirovina dolazi do formiranja razgradnih spojeva hemiceluloze, celuloze i lignina (poput furfurala, hidroksimetilfurfurala, mravlje kiseline, octene kiseline, levulinske kiseline, vanilina, siringaldehida, hidroksibenzaldehida) koji mogu djelovati inhibitori ukoliko bi se dobiveni hidrolizati koristili u daljnjem procesu enzimске biotransformacije (proizvodnja bioetanola) (Alawad i Ibrahim, 2022). U tom smislu, proces proizvodnje reducirajućih šećera iz dobivenog precipitata može rezultirati reduciranom akumulacijom nepoželjnih razgradnih spojeva budući da dobiveni precipitat ne sadrži potencijale izvore inhibitora (poput lignina). Proces saharifikacije dobivenog precipitata mogao bi se provesti primjenom enzimске tehnologije, čime je moguće provesti hidrolizu u smjeru proizvodnje specifičnih produkata (Baral i sur., 2022). U korist navedenoj konstataciji dodatno doprinosi činjenica da korišteni radni mikroorganizam u ovom istraživanju, *T. lanuginosus*, tijekom svoje metaboličke aktivnosti producira koktel hidrolitičkih enzima koji se mogu koristiti u svrhu proizvodnje jednostavnijih šećera hidrolizom polisaharida (Singh i sur., 2003).



**Slika 36.** Maseni udio reducirajućih šećera izmjeren prije, tijekom i nakon kiseline hidrolize različite početne mase liofiliziranog precipitata dobivenog nakon prvog stupnja pročišćavanja lipaze postupnom precipitacijom pomoću acetona

#### 4.5.5.2. Kemijska analiza druge frakcije (koncentrata)

Vodeni ekstrakt TLL pripremljen ekstrakcijom biološki obrađene bučine pogače predstavlja kompleksni matriks kojega čine različite interferirajuće tvari koje je potrebno ukloniti u svrhu pripreme visokokvalitetnog enzimskog preparata. Bučina pogača sadrži široki spektar različitih spojeva, kao što su polifenoli, lipidi, pigmenti, organske kiseline i ugljikohidrati, koji uvelike ometaju ekstrakciju i pročišćavanje proteina (Niu i sur., 2018). U prethodnom paragrafu priloženi su te argumentirani rezultati precipitacije polisaharida i kontaminirajućih proteina primjenom vodene otopine acetona u volumnom udjelu od 45%. U drugom stupnju pročišćavanja, u djelomično pročišćeni supernatant dodan je aceton (u omjeru 1:1) čime je ukupni volumni udio acetona iznosio 72,5% (v/v). Nakon precipitacije TLL, dobivena organska frakcija podvrgnuta je vakuum uparivanju. Nakon uparivanja, dobivene su dvije frakcije, aceton i koncentrat. Aceton se može reciklirati te ponovo koristiti tijekom pročišćavanja lipaze, dok koncentrat predstavlja izvor biološki aktivnih spojeva čime je u potpunosti zatvoren ciklus ekološki prihvatljive proizvodnje lipaze bez akumulacije kemijskog ili biološkog otpada što je temelj predloženog koncepta biorafinerije u ovom istraživanju.



U dobivenom koncentratu izmjereni su ukupni polifenoli ( $38,90 \pm 0,17 \text{ mg}_{\text{GA}}/\text{g}_{\text{st}}$ ), ukupni flavonoidi ( $2,91 \pm 0,01 \text{ mg}_{\text{KA}}/\text{g}_{\text{st}}$ ) te antioksidacijska aktivnost ( $11,58 \pm 0,24 \text{ mg}_{\text{trolox}}/\text{g}_{\text{st}}$ ). Usporedbom s rezultatima izmjerenim u ekstraktima biološki neobrađene bučine pogače (pogledati poglavlje 4.6.10.), zabilježeno je povećanje koncentracije ukupnih polifenola (10,73 puta), ukupnih flavonoida (3,80 puta) i antioksidacijske aktivnosti (14,23 puta) u koncentratu dobivenom nakon pročišćavanja TLL. U istraživanju provedenog od Meneses i sur. (2013) ispitan je utjecaj različitih otapala (metanol, etanol, aceton, heksan, etil acetat, voda, smjese metanol:voda, smjese etanol:voda i smjese aceton:voda) na ekstrakciju polifenola iz matriksa bogatog proteinima (pivski trop,  $C_{\text{protein}} = 24,69 \text{ g}/100\text{g}_{\text{st}}$ ). Prema dobivenim rezultatima, najveća koncentracija ukupnih polifenola izmjerena je u ekstraktu dobivenog primjenom acetona u volumnom udjelu od 60% (v/v) te je maseni udio ukupnih polifenola iznosio  $9,9 \text{ mg}_{\text{GA}}/\text{g}_{\text{st}}$ . Prema tvrdnjama autora navedenog istraživanja, primjena vodene otopine acetona (50 – 95% v/v) navodi se kao jedno od najučinkovitijih otapala za ekstrakciju polifenola iz različitih prirodnih izvora, posebno iz uzoraka bogatih proteinima budući da mješavina aceton:voda može disocirati komplekse polifenol-protein čime se povećava ekstraktibilnost polifenolnih spojeva uz istovremenu precipitaciju kontaminirajućih proteina.

Uzevši u obzir početnu masu liofilizata korištenog tijekom pročišćavanja TLL (2 g), maseni udio suhe tvari liofilizata (98,64%) te korišteni volumen vodene otopine acetona ( $40 \text{ cm}^3$ ), masena koncentracija polifenola u dobivenom koncentratu iznosila je  $1,92 \text{ mg}/\text{cm}^3$ . Usporedivši dobivene rezultate s prosječnom koncentracijom ukupnih polifenolnih spojeva u bijelim vinima ( $0,2 - 0,5 \text{ mg}/\text{cm}^3$ ) i crnim vinima ( $1 - 5 \text{ mg}/\text{cm}^3$ ) (Gutiérrez-Escobar i sur., 2021) jasno je da je dobiveni koncentrat izuzetno bogat visokovrijednim prirodnim antioksidansima.

Sukladno rezultatima, može se zaključiti da predloženi postupak pročišćavanja lipaze rezultira proizvodnjom tri visokovrijedna produkta: djelomično pročišćena TLL visoke volumne aktivnosti i operativne stabilnosti, ugljikohidratnim precipitatom kao izvorom jednostavnih šećera, te koncentratom biološki aktivnih polifenolnih spojeva.

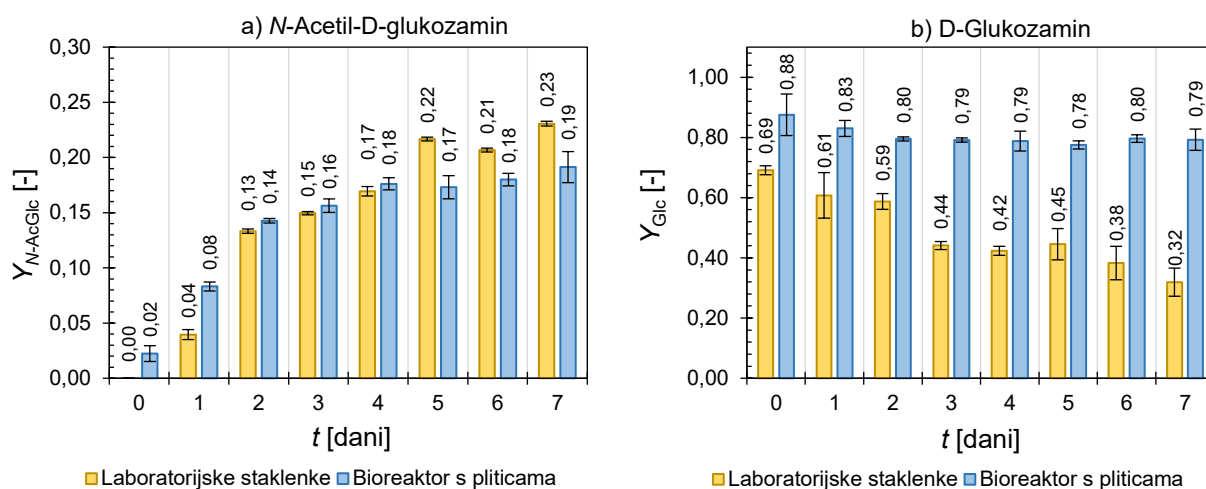
## 4.6. REZULTATI KEMIJSKE ANALIZE BUČINE POGAČE

Da bi se ispitaio utjecaj biološke obrade bučine pogače na kemijski sastav supstrata te provela procjena zdravstvene ispravnosti biološki obrađenog materijala kao potencijalno nutritivno obogaćene stočne hrane, provedena je kemijska analiza supstrata prije, tijekom i nakon SSF procesa. U tu svrhu, provedena je biološka obrada bučine pogače u laboratorijskim staklenkama (prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.4.4.) i u bioreaktoru s pliticama (prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.8.2.). Usporedni rezultati dobiveni nakon provedenih mjerenja prikazani su grafički. Rezultati dobiveni za početni uzorak bučine pogače (nesterilizirana i biološki neobrađena bučina pogača) označeni su u rezultatima za vrijeme fermentacije  $t = 0$  dan. Svi rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti od najmanje tri ponavljanja svake ispitne metode. Uz rezultate srednjih vrijednosti, prikazane su i standardne devijacije mjerenja.

### 4.6.1. Rezultati analize masenog udjela *N*-acetil-D-glukozamina i D-glukozamina

Spojevi *N*-acetil-D-glukozamin i D-glukozamin su monomerne jedinice biopolimera hitina i kitozana te predstavljaju građevne jedinice staničnog zida gljiva (Zamani i sur., 2008). Mjerenjem koncentracije navedenih spojeva tijekom mikrobiološkog procesa moguće je pratiti tijek rasta mikroorganizma određivanjem koncentracije biomase navedenom indirektnom metodom. Osim toga, prema udjelu *N*-acetil-D-glukozamina i D-glukozamina moguće je provesti morfološku karakterizaciju mikroorganizma (Mohammadi i sur., 2012). Rezultati istraživanja su pokazali da filamentozne gljive sintetiziraju veću koncentraciju hitina i kitozana, usporedno s drugim morfološkim oblicima poput stanica kvasca (Mohammadi i sur., 2012). Prema rezultatima dobivenim u ovom istraživanju (**Slika 37a**) prinos *N*-acetil-D-glukozamina povećava se tijekom biološke obrade bučine pogače provedenog u laboratorijskim staklenkama i u bioreaktoru s pliticama do trećeg dana SSF procesa. Nakon trećeg dana prinos *N*-acetil-D-glukozamina nije se značajno mijenjao. Prema dobivenim rezultatima, porast koncentracije biomase izmjeren indirektnom metodom (mjerenjem prinosa *N*-acetil-D-glukozamina) može se povezati s profilom proizvodnje lipaze, budući da su maksimalne koncentracije *N*-acetil-D-glukozamina, a time i najveća koncentracija biomase te maksimalna proizvodnja lipaze pokazale isti trend tijekom SSF procesa. Prema rezultatima mjerenja koncentracije D-glukozamina (**Slika 37b**) vidljivo je da je u početnom uzorku detektirana prisutnost D-glukozamina. Veći udio D-glukozamina izmjeren je u inokuliranom uzorku bučine pogače pripremljenog za SSF proces u bioreaktoru s pliticama (inokulumom pripremljenim uzgojem *T. lanuginosus* na repinim rezancima) usporedno s uzorkom

bez dodanih repinih rezanaca. Tijekom procesa fermentacije u laboratorijskim staklenkama došlo je do redukcije udjela D-glukozamina. Moguća redukcija D-glukozamina posljedica je veće aktivnosti enzima hitinaze iz *T. lanuginosus* koja katalizira reakciju hidrolize hitina (Khan i sur., 2015; Poria i sur., 2021).

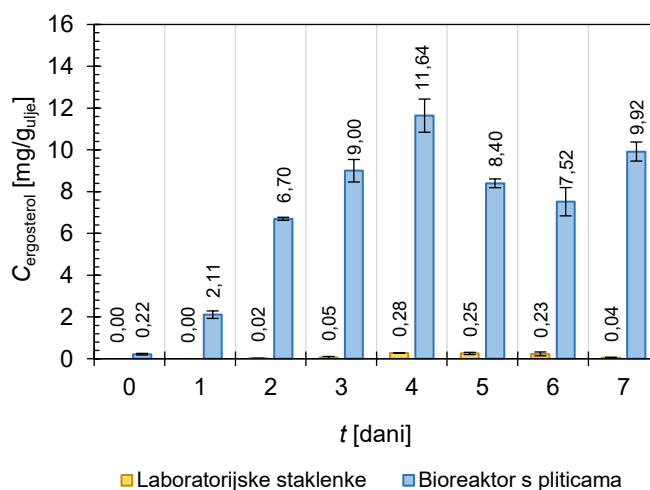


**Slika 37.** Prinos a) *N*-acetil-D-glukozamina i b) D-glukozamina tijekom biološke obrade bučine pogače uzgojem *T. lanuginosus* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

#### 4.6.2. Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize masenog udjela ergosterola

Zbog svog kemijskog sastava ergosterol pripada skupini sterola i važna je komponenta stanične i mitohondrijske membrane gljiva (održava strukturu, fluidnost i propusnost stanične membrane) (Rodrigues, 2018). Budući da je ergosterol prisutan u kemijskoj strukturi stanične membrane gljiva, određivanje koncentracije ergosterola može se primijeniti kao indirektna metoda za mjerenje koncentracije biomase tijekom procesa fermentacije (Mansoldo i sur., 2020). Koncentracija ergosterola ovisi o okolišnim čimbenicima, staničnoj detoksikaciji, transportu hranjivih tvari i interakciji s potencijalno prisutnim patogenom (Bhattacharya, 2021). Prema rezultatima prikazanim na **Slici 38**, za procese promatrane u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama, zabilježeno je povećanje masenog udjela ergosterola do četvrtog dana fermentacije, nakon čega slijedi redukcija koncentracije ergosterola. Maksimalni maseni udio ergosterola izmjeren u laboratorijskim staklenkama iznosio je  $0,28 \pm 0,01$  mg/g<sub>ulje</sub>, dok je maksimalni udio ergosterola izmjeren u biološki obrađenom uzorku provedbom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama bio veći za 41,57 puta te je iznosio 11,64 mg/g<sub>ulje</sub>. Uzevši u obzir usporedne rezultate dobivene tijekom praćenja SSF procesa u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama te

navedene literaturne činjenice, moguće je objasniti dobivene rezultate mjerenja koncentracije ergosterola prema kojima je veća koncentracija ergosterola izmjerena tijekom procesa fermentacije provedenog u bioreaktoru s pliticama. Budući da je veća koncentracija ergosterola (odnosno veća koncentracija biomase) izmjerena tijekom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama, dobiveni rezultati mogu se povezati i s većom proizvodnjom lipaze izmjerenom tijekom biološke obrade bučine pogače u bioreaktoru s pliticama.

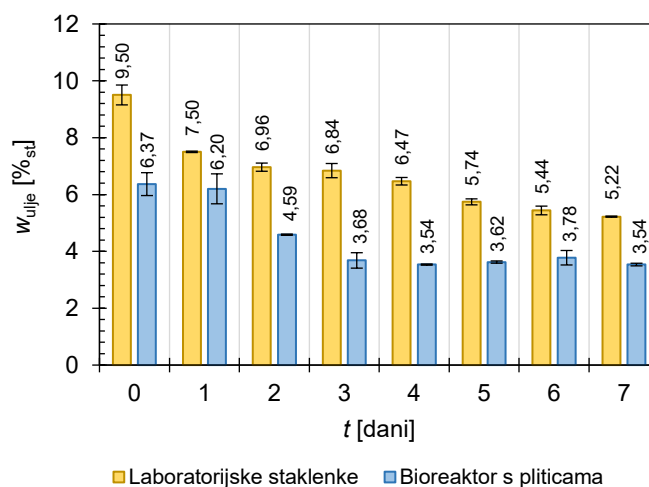


**Slika 38.** Masena koncentracija ergosterola u uzorcima biološki obrađene bučine pogače uzgojem *T. lanuginosus* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

#### 4.6.3. Rezultati određivanja masenog udjela slobodnih masti

Istraživanja su pokazala da udio ulja u supstratu tijekom proizvodnje lipaze SSF procesom značajno utječe na učinkovitost procesa. Primjerice, u svrhu maksimalne proizvodnje lipaze uzgojem *A. niger* na pljevici ječma da bi se postignula maksimalna aktivnost lipaze od 58,6 U/g<sub>st</sub>, u supstrat je bilo potrebno dodati 2% (w/w) maslinovog ulja (Damaso i sur., 2008). U istraživanju provedenog od grupe autora Fernandes i sur. (2007) proveden je SSF proces proizvodnje lipaze uzgojem *B. cepacia* na kukuruznim mekinjama uz dodatak kukuruznog ulja (8%, w/w) te je izmjerena maksimalna aktivnost lipaze od 108 U/g<sub>st</sub>. Iako je dodavanje ulja tijekom SSF procesa rezultiralo poboljšanom proizvodnjom lipaze, dodavanje ulja može značajno utjecati na ekonomičnost proizvodnje enzima. Iz tog razloga, za proizvodnju lipaze mogu se koristiti nusprodukti industrije ulja poput uljnih pogača koje u svom sastavu sadrže određeni udio ulja. U ovom istraživanju korištena je bučina pogača, kao nusprodukt prehrambene industrije, s udjelom ulja od  $9,50 \pm 0,35\%$ <sub>st</sub> (**Slika 39**). Tijekom provedbe procesa fermentacije u laboratorijskim staklenkama u trajanju od 7 dana, vidljivo je da je došlo do redukcije masenog udjela ulja za

45,06%. Odnosno, nakon SSF procesa u laboratorijskim staklenkama maseni udio ulja iznosio je  $5,22 \pm 0,02\%_{st}$ . Slični rezultati zabilježeni su proizvodnjom lipaze u bioreктору s pliticama u kojemu je došlo do redukcije početnog udjela ulja za 44,27% iz čega se može zaključiti da *T. lanuginosus* za svoj rast i metaboličku aktivnost može koristiti ulje kao izvor ugljika. Nadalje, veća aktivnost lipaze izmjerena je tijekom SSF procesa u bioreктору s pliticama iako je početni udio ulja bio niži ( $6,37 \pm 0,40\%_{st}$ ) kao posljedica dodatka inokuluma pripremljenog na repinim rezancima. Dobiveni rezultati ukazuju na činjenicu da je početni udio ulja od 6,37% dostatan za produkciju lipaze u predloženom SSF procesu.



**Slika 39.** Maseni udio ulja u uzorcima biološki obrađene bučine pogače uzgojem *T. lanuginosus* u laboratorijskim staklenkama i bioreктору s pliticama

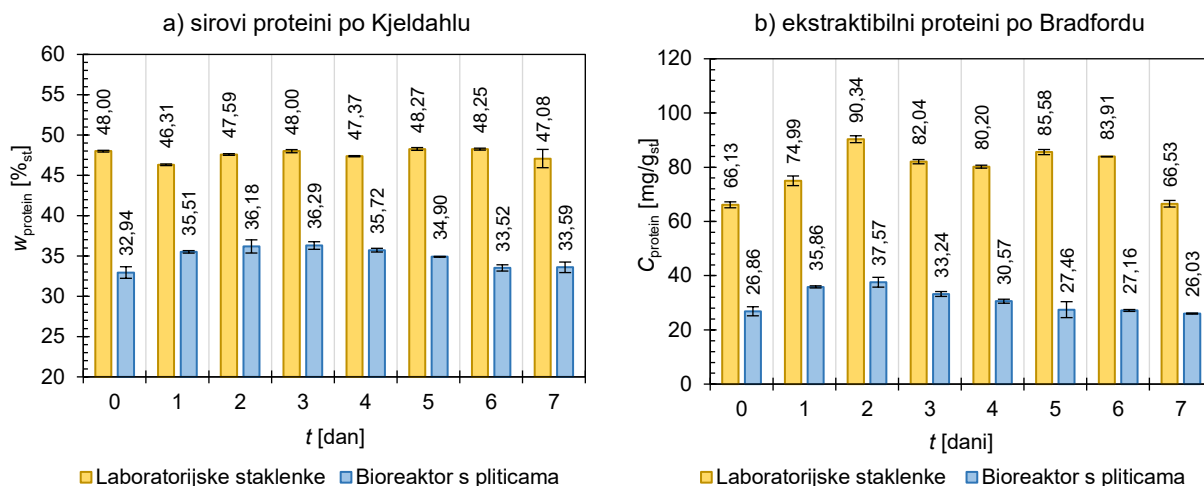
#### 4.6.4. Rezultati određivanja masenog udjela sirovih proteina po Kjeldahlu i ekstraktibilnih proteina po Bradfordu

Uljne pogače predstavljaju proteinski obogaćen i djelomično odmašćen nusprodukt zaostao nakon proizvodnje biljnih ulja. Kao takve, uljne pogače imaju veliku primjenu u proizvodnji proteinskih nadomjestaka kao zamjena animalnim proteinskim izvorima. Kvaliteta i funkcionalna svojstva ekstrahiranih bjelančevina uljne pogače ne samo da nadopunjuju postojeće izvore bjelančevina za ljudsku prehranu i animalnu ishranu, već rješavaju i problem zbrinjavanja pogača te predstavljaju dodatni prihod proizvođačima i prerađivačima uljarica. Samim time, proizvodnja proteinskih nadomjestaka iz uljnih pogača može značajno reducirati ekološki otisak (engl. *Ecological footprint*) i ugljični otisak (engl. *Carbon footprint*) na okoliš usporedno s proizvodnjom proteinskih proizvoda animalnog porijekla (Singh i sur., 2022). Prema dobivenim rezultatima (**Slika 40a**) udio sirovih proteina u bučinoj pogači iznosio je  $48 \pm 0,11\%_{st}$ . Prema literaturnim

podacima, udio sirovih proteina u bučinoj pogači može se iznositi od 45,6%<sub>st</sub> do 59,8%<sub>st</sub> (Budžaki i sur., 2018a). Tijekom provedbe SSF procesa u laboratorijskim staklenkama udio sirovih proteina bio je u rasponu od 46,31%<sub>st</sub> do 48,27%<sub>st</sub>, te u bioreaktoru s pliticama od 32,94%<sub>st</sub> do 36,29%<sub>st</sub>. Niži udio sirovih proteina u svim uzorcima izuzetih tijekom biološke obrade bučine pogače u bioreaktoru s pliticama posljedica je dodatka inokuluma pripremljenog na repinim rezancima. Udio sirovih proteina u repinim rezancima niži je nego u bučinoj pogači, odnosno iznosi od 20% do 35% (Rana i sur., 2022).

Veći maseni udio ekstraktibilnih proteina izmjeren je u eksperimentu provedenog u laboratorijskim staklenkama (**Slika 40b**). Maseni udio ekstraktibilnih proteina tijekom SSF procesa u laboratorijskim staklenkama bio je u rasponu od  $66,13 \pm 1,10$  mg/g<sub>st</sub> do  $90,34 \pm 1,27$  mg/g<sub>st</sub>. Najveći maseni udio ekstraktibilnih proteina izmjeren je nakon drugog dana SSF procesa uz povećanje od 1,36 puta. Maseni udio ekstraktibilnih proteina tijekom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama bio je u rasponu od  $26,03 \pm 0,19$  mg/g<sub>st</sub> do  $37,57 \pm 1,81$  mg/g<sub>st</sub>. Najveći maseni udio ekstraktibilnih proteina izmjeren je nakon drugog dana SSF procesa uz povećanje od 1,40 puta.

Tijekom biološke obrade bučine pogače povećanje udjela sirovih proteina može biti rezultat proizvodnje biomase radnog mikroorganizma ili povećanje udjela sirovih proteina na račun smanjenja udjela drugih komponenti bučine pogače (primjerice smanjenje udjela ulja u bučinoj pogači tijekom SSF procesa, vidi poglavlje 4.6.3.). Smanjenje udjela sirovih proteina može biti povezana s potencijalnom aktivnosti proteaza produciranih od radnog mikroorganizma. Slični rezultati zabilježeni su prilikom mjerenja udjela sirovih proteina nakon biološke obrade različitih uljnih pogača (bučina pogača, konopljina pogača, pogača lana) pomoću *H. grisea* u trajanju od 10 dana (Budžaki i sur., 2018a).

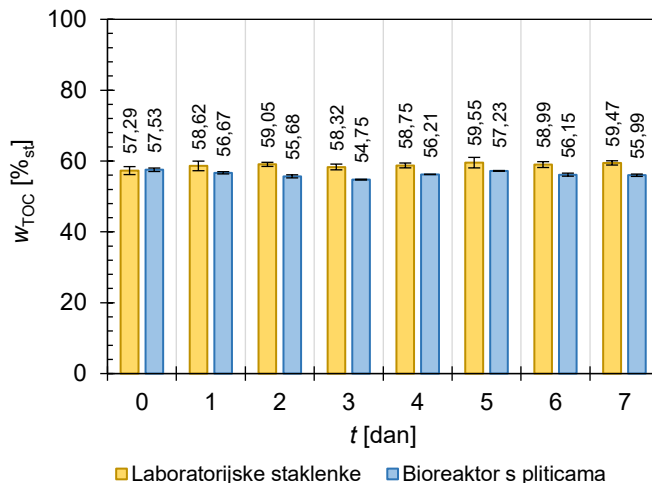


**Slika 40.** a) Maseni udio sirovih proteina određeni po Kjeldahlu i b) maseni udio ekstraktibilnih proteina određeni Bradfordičinom metodom u uzorcima biološki obrađene bučine pogače uzgojem *T. lanuginosus* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

#### 4.6.5. Rezultati određivanja masenog udjela ukupnog ugljika u krutim uzorcima

Maseni udio ukupnog organskog ugljika tijekom SSF procesa u laboratorijskim staklenkama bio je u rasponu od  $57,29 \pm 1,12\%_{st}$  do  $59,55 \pm 1,48\%_{st}$ . Provedbom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama, maseni udio ukupnog organskog ugljika bio je u rasponu od  $55,68 \pm 0,44\%_{st}$  do  $57,53 \pm 0,49\%_{st}$ . Prema rezultatima (**Slika 41**) vidljivo je da se udio ukupnog organskog ugljika tijekom provedbe SSF procesa nije značajno mijenjao.

Promjene masenog udjela ukupnog organskog ugljika i ukupnog dušika u supstratu tijekom fermentacije mogu imati značajan utjecaj na tijek i prinos procesa. Na primjer, omjer ugljika i dušika u supstratu izravno utječe na prinos bioplina tijekom anaerobne digestije i proizvodnje biometana (Ghaleb i sur., 2021). U ovom istraživanju, iako nije došlo do značajne promjene masenog udjela ukupnog organskog ugljika i ukupnog dušika tijekom SSF procesa (rezultati prikazani kao maseni udio sirovih proteina određeni metodom prema Kjeldahlu, poglavlje 4.6.4.) vidljivo je da dodatkom repinih rezanaca prilikom inokulacije bučine pogače u svrhu provedbe SSF procesa u bioreaktoru s pliticama rezultira značajnom promjenom C:N omjera. Promjena C:N omjera mogla je utjecati na profil proizvodnje lipaze kao i na povećanje proizvodnje lipaze provedbom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama, kao i većom produkcijom ergosterola (biomase).



**Slika 41.** Maseni udio organskog ugljika u uzorcima biološki obrađene bučine pogače uzgojem *T. lanuginosus* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

#### 4.6.6. Rezultati određivanja masenog udjela sirovih vlakana

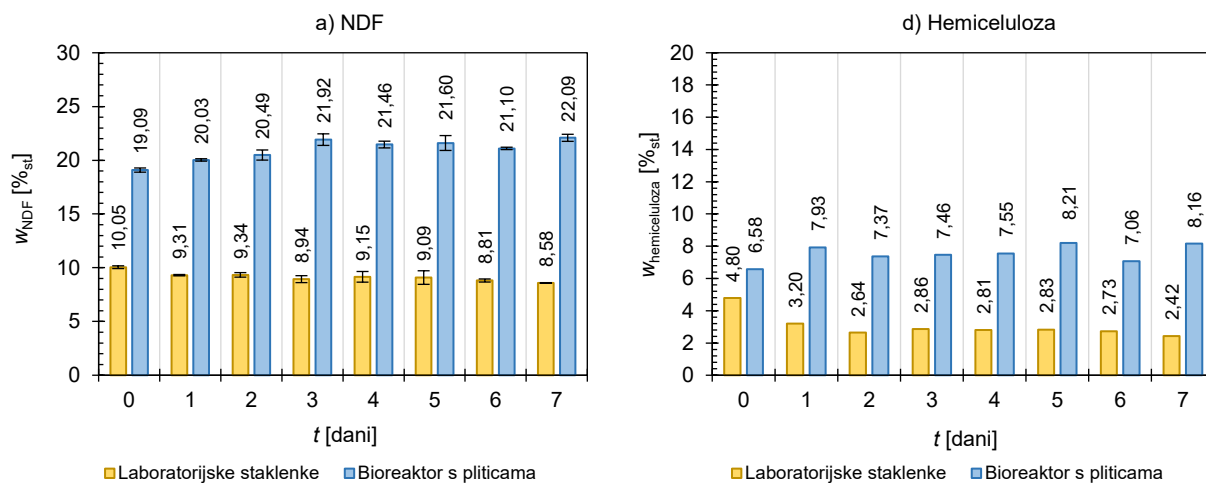
Prema dobivenim rezultatima određivanja vlakana bučine pogače (**Slika 42 a – c**) vidljivo je da je maseni udio za NDF, ADF i ADL iznosio  $10,05 \pm 0,13\%_{st}$ ,  $5,25 \pm 0,16\%_{st}$ , i  $0,93 \pm 0,34\%_{st}$  što je u skladu s prethodno publiciranim rezultatima (Budžaki i sur., 2018a). Inokulacijom bučine pogače inokulumom pripremljenim uzgojem *T. lanuginosus* na repinim rezancima, rezultiralo je povećanjem udjela navedenih vlakana u supstratu tijekom SSF procesa ( $w_{NDF} = 19,09 \pm 0,20\%_{st}$ ,  $w_{ADF} = 12,51 \pm 0,97\%_{st}$ , te  $w_{ADL} = 1,30 \pm 0,28\%_{st}$ ). Povećanje udjela vlakana u supstratu dodatkom inokuluma posljedica je većeg udjela vlakana u repinim rezancima (NDF =  $389 \pm 2$  g/kg, ADF =  $229 \pm 2$  g/kg) nego u bučinoj pogači (Vázquez-de-Aldana i sur., 2020).

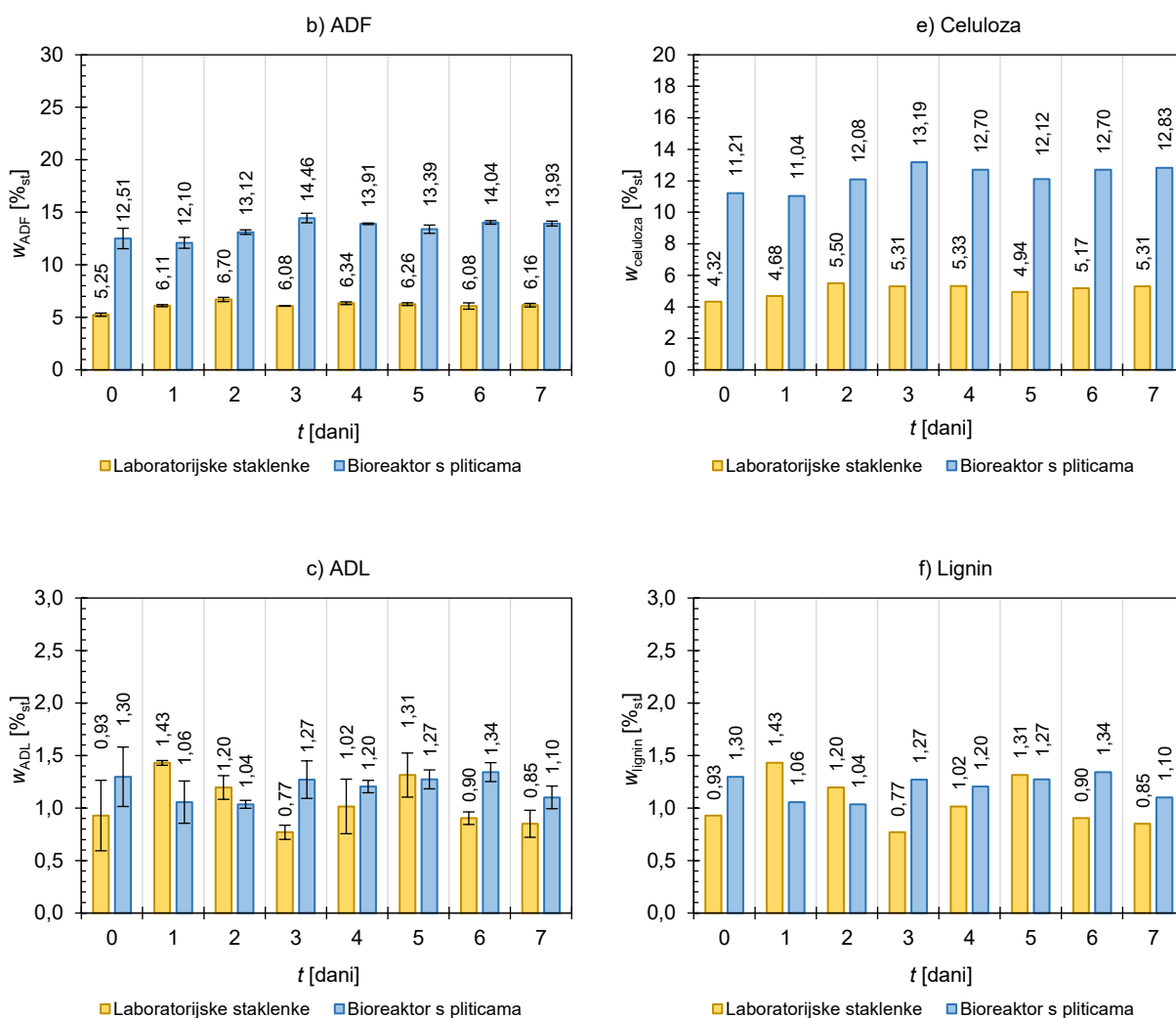
Prema dobivenim rezultatima za maseni udio NDF, ADF i ADL izračun je udio hemiceluloze, celuloze i lignina. Prema rezultatima (**Slika 42 d – f**) vidljivo je da je udio hemiceluloze i celuloze u bučinoj pogači podjednak te iznosi  $4,80\%_{st}$  i  $4,32\%_{st}$ , dok je udio lignina iznosio  $0,93\%_{st}$ . Dodatkom repinih rezanaca kao inokuluma promijenjen je udio pojedinačnih vlakana. Udio hemiceluloze, celuloze i lignina iznosio je  $6,58\%_{st}$ ,  $11,21\%_{st}$  i  $1,30\%_{st}$ . Osim povećanja udjela pojedinačnih vlakana, dodatkom repinih rezanaca kao inokuluma povećao se maseni udio celuloze u odnosu na hemicelulozu. Prema rezultatima dobivenih mjerenjem masenog udjela hemiceluloze, vidljivo je da je došlo do redukcije udjela hemiceluloze sa  $4,80\%_{st}$  na  $2,42\%_{st}$  tijekom SSF procesa u laboratorijskim staklenkama. Istodobno, došlo je do povećanja masenog udjela hemiceluloze sa  $6,58\%_{st}$  na  $8,16\%_{st}$  tijekom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama. Navedeno može biti povezano s činjenicom da *T. lanuginosus* u početku za svoj rast koristi jednostavne i



lako dostupne izvore ugljika kao što su jednostavni šećeri. Nakon toga slijedi proizvodnja hidrolitičkih enzima koji kataliziraju reakciju hidrolize složenih polisaharida u jednostavnije polisaharide (Gramany i sur., 2015). Budući da je nakon dodatka repinih rezanaca kao inokuluma udio reducirajućih šećera bio veći u eksperimentu provedenog u bioreaktoru s pliticama, usporedno sa supstratom pripremljenog za SSF proces u laboratorijskim staklenkama (vidi poglavlje 4.6.8.), može se argumentirati veća redukcija masenog udjela hemiceluloze u supstratu provedbom SSF procesa u laboratorijskim staklenkama na račun proizvodnje reducirajućih šećera potrebnih radnom mikroorganizmu kao izvor ugljika za rast i metaboličku aktivnost.

Tijekom SSF procesa u laboratorijskim staklenkama udio celuloze povećao se sa 4,32%<sub>st</sub> na 5,31%<sub>st</sub>, te u bioreaktoru s pliticama sa 11,21%<sub>st</sub> na 12,83%<sub>st</sub>. Povećanje udjela celuloze može se argumentirati činjenicom da *T. lanuginosus* ne producira enzim celulazu koja bi katalizirala hidrolizu celuloze na jednostavnije ugljikohidrate (Manimaran i sur., 2009), čime je povećanje masenog udjela celuloze u supstratu tijekom SSF procesa posljedica potrošnje ostalih komponenti supstrata.



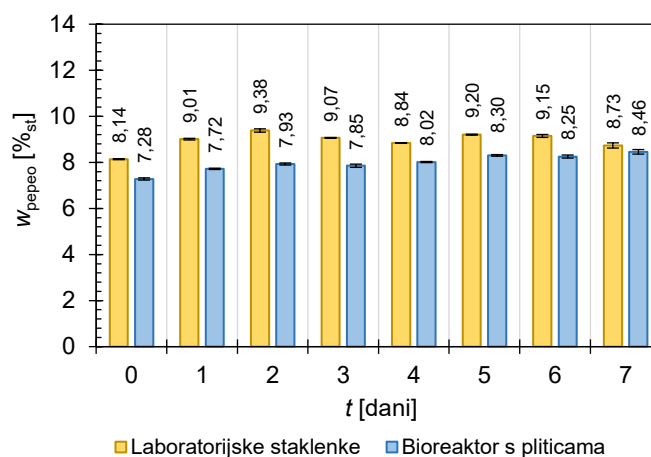


**Slika 42.** Maseni udio sirovih vlakana u uzorcima biološki obrađene bučine pogače uzgojem *T. lanuginosus* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

#### 4.6.7. Rezultati određivanja masenog udjela pepela

U biogospodarstvu, obnovljiva lignocelulozna biomasa važna je sirovina koja se može koristiti u procesu konverzije u biogoriva, kemikalije, električnu energiju i toplinu. Određeni maseni udio biomase čine anorganske komponente (pepeo) koje se ne mogu konvertirati u energiju. Stoga je potrebno poznavati udio pepela u sirovini pri odabiru odgovarajuće metode konverzije lignocelulozne biomase (Bakker i Elbersen, 2005). Nadalje, maseni udio pepela predstavlja udio ukupnih minerala u uzorku čime udio pepela može biti važan sa stajališta prehrane, toksikologije i kvalitete hrane (Harris i Marshall, 2017). Prema literaturnim podacima, maseni udio pepela u

bučinoj pogači kreće se od  $6,09\%_{st}$  do  $7,82\%_{st}$  (Kachel-Jakubowska i sur., 2016; Budžaki i sur., 2018a; Morejón Caraballo i sur., 2023). Maseni udio pepela izmjeren u bučinoj pogači korištenoj u ovom istraživanju iznosi  $8,14 \pm 0,02\%_{st}$  (**Slika 43**). Dodatkom inokuluma (repinih reznaca) maseni udio pepela iznosio je  $7,28 \pm 0,05\%_{st}$ . Tijekom procesa fermentacije u laboratorijskim staklenkama udio pepela bio je u rasponu od  $8,14 \pm 0,02\%_{st}$  do  $9,38 \pm 0,07\%_{st}$  (najveći maseni udio pepela izmjeren nakon drugog dana fermentacije). Provedbom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama maseni udio pepela bio je u rasponu od  $7,28 \pm 0,05\%_{st}$  do  $8,46 \pm 0,10\%_{st}$ , te je maksimalni udio pepela izmjeren nakon sedmog dana fermentacije.



**Slika 43.** Maseni udio pepela u uzorcima biološki obrađene bučine pogače uzgojem *T. lanuginosus* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

#### 4.6.8. Rezultati određivanja masenog udjela reducirajućih i pojedinačnih šećera

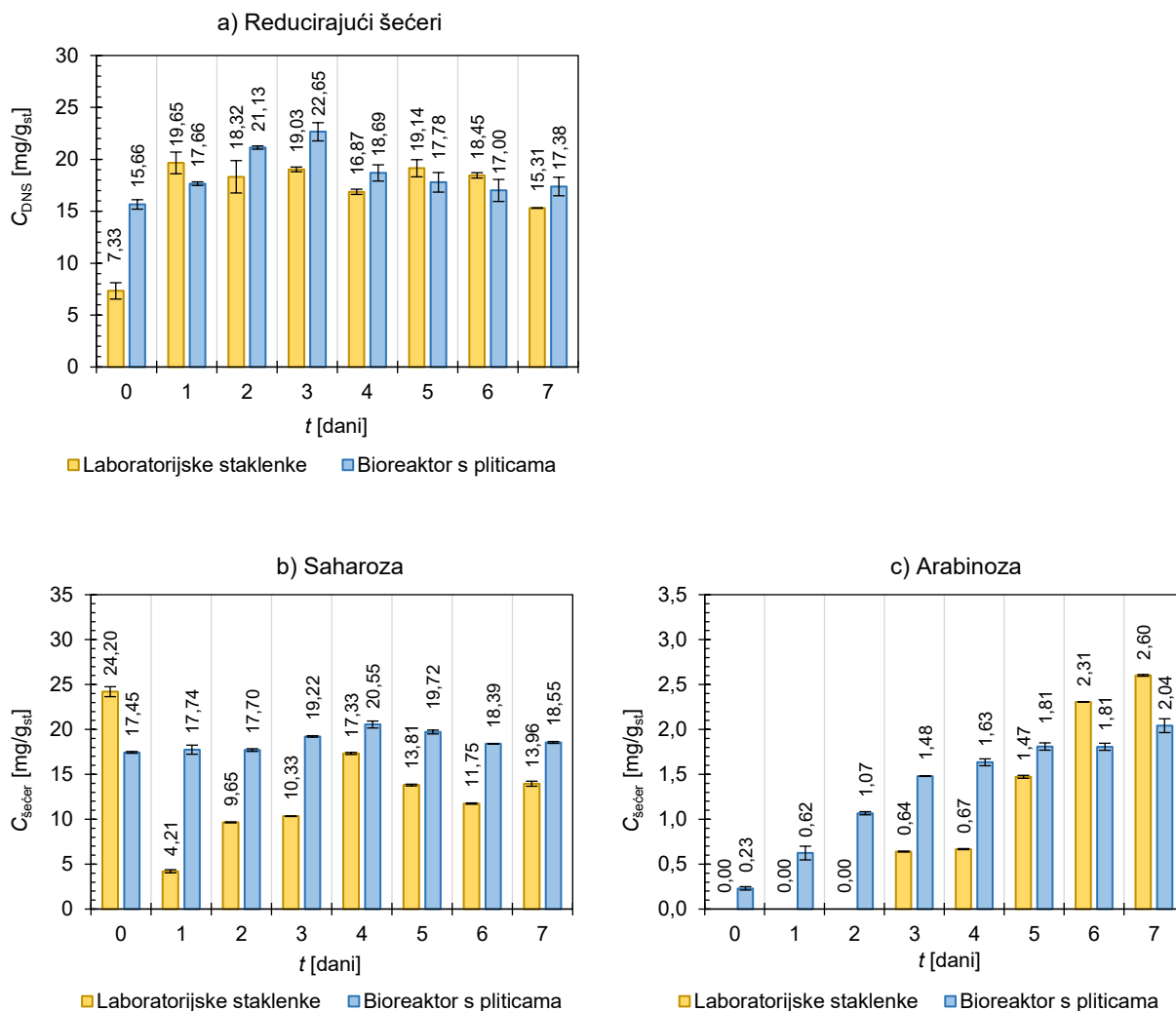
U istraživanju provedenog od grupe autora Mchunu i sur. (2013) provedena je karakterizacija utjecaja 95 izvora ugljika na uzgoj i rast *T. lanuginosus*. Rezultati istraživanja pokazali su da *T. lanuginosus* može asimilirati širok spektar izvora ugljika za svoj rast i metaboličku aktivnost, uključujući ugljikohidrate, aminokiseline, karboksilne kiseline, polimere, aromatske spojeve, estere, fosforilirane i šećerne alkohole. Ugljikohidratni izvori (pojedinačni šećeri i oligosaharidi) pokazali su najveći utjecaj na rast gljive. Od svih ispitanih jednostavnih šećera, primjena ksiloze rezultirala je povećanom proizvodnjom biomase usporedno s primjenom drugih jednostavnih šećera. Nadalje, od ispitanih disaharida saharoza je imala najveći učinak na proizvodnju micelija *T. lanuginosus*. U ovom istraživanju provedeno je mjerenje masenog udjela reducirajućih šećera DNS metodom te masenog udjela pojedinačnih šećera UHPLC vodenog ekstrakta supstrata

korištenog tijekom procesa proizvodnje lipaze u laboratorijskim staklenkama i u bioreaktoru s pliticama uzgojem *T. lanuginosus*.

Prema dobivenim rezultatima mjerenja masenog udjela reducirajućih šećera (**Slika 44a**), vidljivo je da bučina pogača sadrži  $7,33 \pm 0,79$  mg/g<sub>st</sub> reducirajućih šećera. Tijekom 24 sata fermentacije u laboratorijskim staklenkama, došlo je do povećanja masenog udjela reducirajućih šećera za 2,68 puta ( $19,65 \pm 1,04$  mg/g<sub>st</sub>). Povećanje masenog udjela reducirajućih šećera može se povezati s rezultatima dobivenim mjerenjem masenog udjela hemiceluloze (poglavlje 4.6.6., **Slika 42d**) iz čega je vidljivo da je u prva 24 sata SSF procesa došlo do redukcije masenog udjela hemiceluloze čime je potencijalno došlo do oslobađanja reducirajućih šećera. Rezultati UHPLC analize pojedinačnih šećera u vodenom ekstraktu bučine pogače (**Slika 44b**) pokazali su da je saharoza dominantan šećer ( $24,20 \pm 0,55$  mg/g<sub>st</sub>) što je u skladu s literaturnim podacima (Budžaki i sur., 2018a). Tijekom 24 sata fermentacije u laboratorijskim staklenkama došlo je do smanjenja masenog udjela saharoze na  $4,21 \pm 0,17$  mg/g<sub>st</sub>. Također, primijenjenom kromatografskom metodom analize pojedinačnih šećera nije utvrđen porast koncentracije jednostavnih šećera tijekom SSF procesa kao posljedica asimilacije i iskorištavanja oslobođenih šećera za rast gljive. Nakon trećeg dana fermentacije detektiran je jednostavni šećer arabinoza čija se koncentracija tijekom fermentacije povećala do  $2,60 \pm 0,01$  mg/g<sub>st</sub> (**Slika 44c**), dok se maseni udio reducirajućih šećera smanjio na  $15,31 \pm 0,02$  mg/g<sub>st</sub> (**Slika 44a**).

Prema dobivenim rezultatima mjerenja masenog udjela reducirajućih šećera u eksperimentu provedenog u bioreaktoru s pliticama (**Slika 44a**), vidljivo je da je u početku fermentacije početni maseni udio reducirajućih šećera bio veći ( $15,66 \pm 0,46$  mg/g<sub>st</sub>) usporedno s procesom provedenim u laboratorijskim staklenkama kao posljedica dodatka repinih rezanaca korištenih za pripremu inokuluma. Kao posljedica veće početne koncentracije reducirajućih šećera, vidljivo je da se maseni udio reducirajućih šećera nije značajno povećao tijekom 24 sata fermentacije kao što je to bio slučaj prilikom provedbe SSF procesa u laboratorijskim staklenkama. Uzevši dobivene rezultate u razmatranje kao činjenicu da je prisutnost reducirajućih šećera dostatna za rast i razvoj *T. lanuginosus*, mogu se argumentirati rezultati dobiveni mjerenjem masene koncentracije saharoze UHPLC metodom (**Slika 44b**). Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da tijekom 24 sata SSF procesa u bioreaktoru s pliticama nije došlo do asimilacije ili hidrolize saharoze. Povećanje masenog udjela reducirajućih šećera može se povezati s povećanjem koncentracije arabinoze u vodenom ekstraktu supstrata tijekom procesa fermentacije (**Slika 44c**). Prema dobivenim rezultatima, maseni udio reducirajućih šećera povećavao se tijekom prva tri dana SSF procesa, nakon čega je uslijedila redukcija masenog udjela reducirajućih šećera. Dobiveni

rezultati mogu se argumentirati činjenicom da gljiva *T. lanuginosus* producira veliki broj hidrolitičkih enzima ( $\beta$ -ksilanaza,  $\beta$ -ksilozidaza, acetil ksilan esteraza, acetil esteraza,  $\alpha$ -L-arabinofuranoza, *p*-kumaril esteraza, feruloil esteraza,  $\beta$ -glukozidaza,  $\beta$ -manaza,  $\beta$ -manozidaza) (Singh i sur., 2000), te može asimilirati i koristiti široki spektar spojeva kao izvora uljika za svoj rast (Mchunu i sur., 2013). Štoviše, dobiveni rezultati potvrđuju zahtjevnost monitoringa SSF procesa uzgojem mikroorganizama na kompleksnim supstratima poput lignocelulozne biomase.



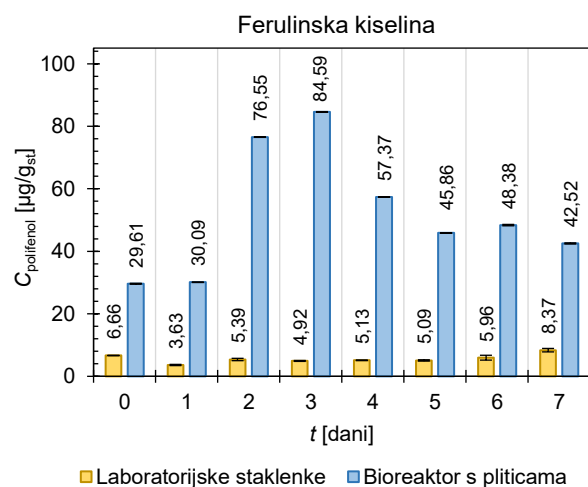
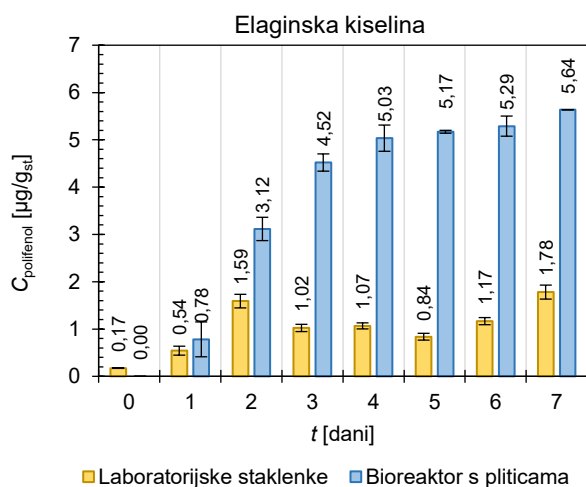
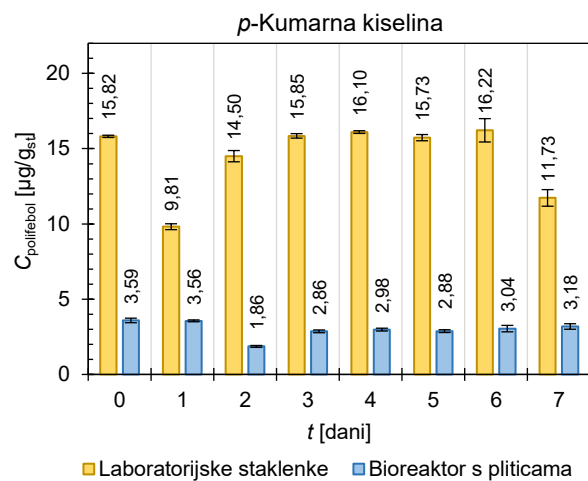
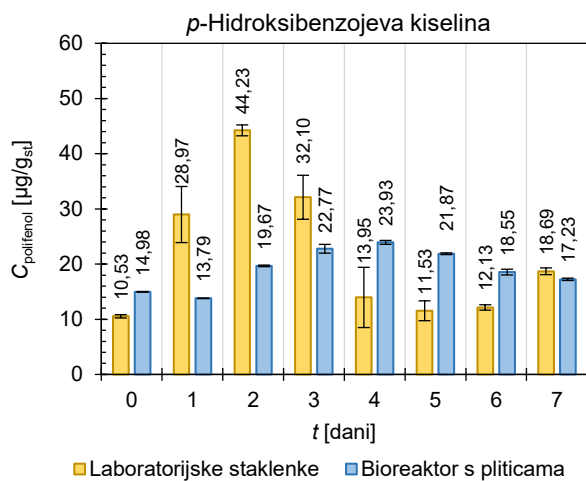
**Slika 44.** Maseni udio reducirajućih i pojedinačnih šećera u uzorcima biološki obrađene bučine pogače uzgojem *T. lanuginosus* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

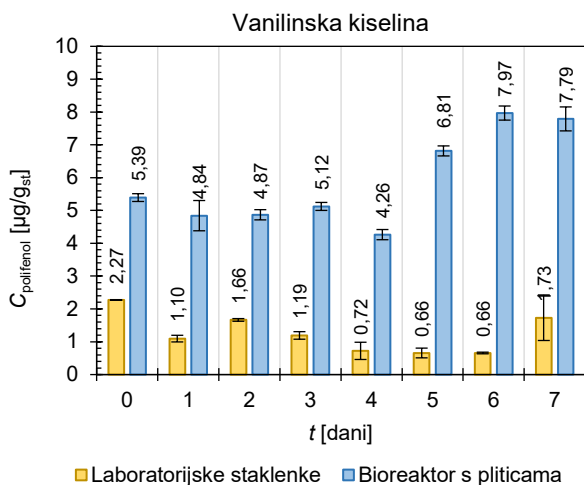
#### 4.6.9. Rezultati analize pojedinačnih polifenola UHPLC metodom

Polifenoli su spojevi s brojnim blagotvornim učincima na ljudsko zdravlje, koji se pripisuju njihovim antioksidativnim, protuupalnim, antialergijskim, antivirusnim, antikancerogenim, antibakterijskim, antimutagenim i kardiovaskularnim svojstvima, usko povezanih s njihovom kemijskom strukturom (Grgić i sur., 2020). Na primjer, derivati hidroksicimetne kiseline kao što su ferulinska kiselina i kafeinska kiselina važni su predstavnici polifenolnih spojeva jer se nalaze u mnogim sastojcima hrane, a njihovi esterificirani oblici pokazuju jedinstvena bioaktivna svojstva (Murtaza i sur., 2014). Bučino ulje je izvor mnogih bioaktivnih spojeva, uključujući polifenolne spojeve kao što su protokatehuinska kiselina, luteolin, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, vanilinska kiselina, kafeinska kiselina, ferulična kiselina, vanilin, *p*-kumarna kiselina, tirosol i siringična kiselina (Dotto i Chacha, 2020). Budući da je identificirana prisutnost polifenolnih spojeva u bučinom ulju, to znači da se postupkom prešanja sjemenki buče određeni udio polifenolnih spojeva ekstrahira u ulju. Nadalje, u istraživanju provedenog od grupe autora Peričin i sur. (2009) dokazana je različita razdioba polifenolnih spojeva u sjemenkama buče (uzevši u obzir sjeme buče bez ljuske, brašno od uljnih pogača, kožicu sjemenke, oljuštenu jezgru i ljusku). Osim različite razdiobe, polifenolni spojevi prisutni u sjemenkama buče mogu se nalaziti u slobodnom obliku i u vezanom (netopljivom) obliku. Polifenoli se mogu vezati za različite biljne komponente esterskim, eterskim ili acetilnim vezama i većinom su ugrađeni u strukturu stanične stijenke. Upravo je navedeno istraživanje pokazalo da su polifenolni spojevi identificirani u sjemenkama buče golice prisutni u obliku vezanih polifenolnih spojeva (84,1% od ukupnih polifenolnih spojeva) (Peričin i sur., 2009).

U ovom istraživanju provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza slobodnih polifenolnih spojeva UHPLC metodom u etanolnom ekstraktu bučine pogače. Prema dobivenim rezultatima (**Slika 45**), u ekstraktu bučine pogače identificirani su i kvantificirani sljedeći polifenolni spojevi, odnosno derivati hidroksibenzojeve kiseline: *p*-Hidroksibenzojeva kiselina ( $10,53 \pm 0,30 \mu\text{g/g}_{\text{st}}$ ), elaginska kiselina ( $0,17 \pm 0,00 \mu\text{g/g}_{\text{st}}$ ) i vanilinska kiselina ( $2,27 \pm 0,00 \mu\text{g/g}_{\text{st}}$ ); te derivati hidroksicimetne kiseline: *p*-Kumarna kiselina ( $15,82 \pm 0,07 \mu\text{g/g}_{\text{st}}$ ) i ferulinska kiselina ( $6,66 \pm 0,15 \mu\text{g/g}_{\text{st}}$ ). Budući da je u svrhu pripreme supstrata za SSF proces u bioreaktoru s pliticama supstrat inokuliran s inokulumom pripremljenim na repinim rezancima, profil polifenolnih spojeva ostao je isti ali se značajno razlikovao u masenom udjelu pojedinačnih polifenolnih spojeva. Tijekom procesa fermentacije u laboratorijskim staklenkama i u bioreaktoru s pliticama došlo je do promjene masenog udjela pojedinačnih polifenolnih spojeva. Primjerice, maseni udio *p*-hidroksibenzojeve kiseline tijekom SSF procesa u laboratorijskim staklenkama povećao se za 4,20 puta nakon drugog dana fermentacije te je iznosio  $44,23 \pm 0,99 \mu\text{g/g}_{\text{st}}$ . Najveći porast masenog udjela

polifenola zabilježen je provedbom SSF procesa u biorektoru s pliticama mjerenjem koncentracije ferulinske kiseline čiji se maseni udio povećao za 2,86 puta nakon trećeg dana fermentacije te je iznosio  $84,59 \pm 1,27 \mu\text{g/g}_{\text{st}}$ . Osim toga, elaginska kiselina nije kvantificirana u uzorku izuzetom neposredno prije fermentacije provedene u biorektoru s pliticama, dok je nakon sedmog dana SSF procesa maseni udio elaginske kiseline iznosio  $5,64 \pm 0,00 \mu\text{g/g}_{\text{st}}$ . Uzevši u obzir navedene činjenice da se polifenolni spojevi u bučinoj pogači uglavnom nalaze u vezanom (esterificiranom) obliku, promjena masenog udjela pojedinačnih polifenolnih spojeva može se povezati s kompleksnim djelovanjem enzima nastalih tijekom metaboličke aktivnosti *T. lanuginosus* (Singh i sur., 2000). Producirani enzimi katalitičkim djelovanjem mogu hidrolizirati veze između polifenolnih spojeva i kompleksa te time poboljšati njihovu ekstraktibilnost i biološku dostupnost.





**Slika 45.** Maseni udio pojedinačnih polifenola u uzorcima biološki obrađene bučine pogače uzgojem *T. lanuginosus* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

#### 4.6.10. Rezultati određivanja masenog udjela ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti

Kao sekundarni metaboliti, polifenoli su važna skupina biološki aktivnih spojeva s antioksidativnim svojstvima. Hidroksilna funkcionalna skupina sadržana u kemijskoj strukturi polifenola može vezati slobodne radikale, što polifenole čini bitnim komponentama u sprječavanju oksidativnih procesa (Grgić i sur., 2020). U prethodnom poglavlju provedena je identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih polifenolnih spojeva UHPLC metodom. U nastavku istraživanja provedeno je spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti.

Prema dobivenim rezultatima (**Slika 46a**) maseni udio ukupnih polifenola u bučinoj pogači iznosio je  $3,63 \pm 0,06$  mg<sub>GK</sub>/g<sub>st</sub>, dok je u uzorku izuzetog neposredno prije provedbe SSF procesa u bioreaktoru s pliticama iznosio  $5,57 \pm 0,39$  mg<sub>GK</sub>/g<sub>st</sub>. Tijekom provedbe biološke obrade bučine pogače došlo je do povećanja masenog udjela ukupnih polifenola. Najveći maseni udio ukupnih polifenola provedbom SSF procesa u laboratorijskim staklenkama izmjeren je nakon sedmog dana fermentacije te je iznosio  $16,87 \pm 0,46$  mg<sub>GK</sub>/g<sub>st</sub> (povećanje masenog udjela ukupnih polifenola za 4,46 puta). Najveći maseni udio ukupnih polifenola provedbom SSF procesa u bioreaktoru s pliticama izmjeren je nakon petog dana fermentacije te je iznosio  $16,96 \pm 0,13$  mg<sub>GK</sub>/g<sub>st</sub> (povećanje masenog udjela ukupnih polifenola za 3,05 puta).

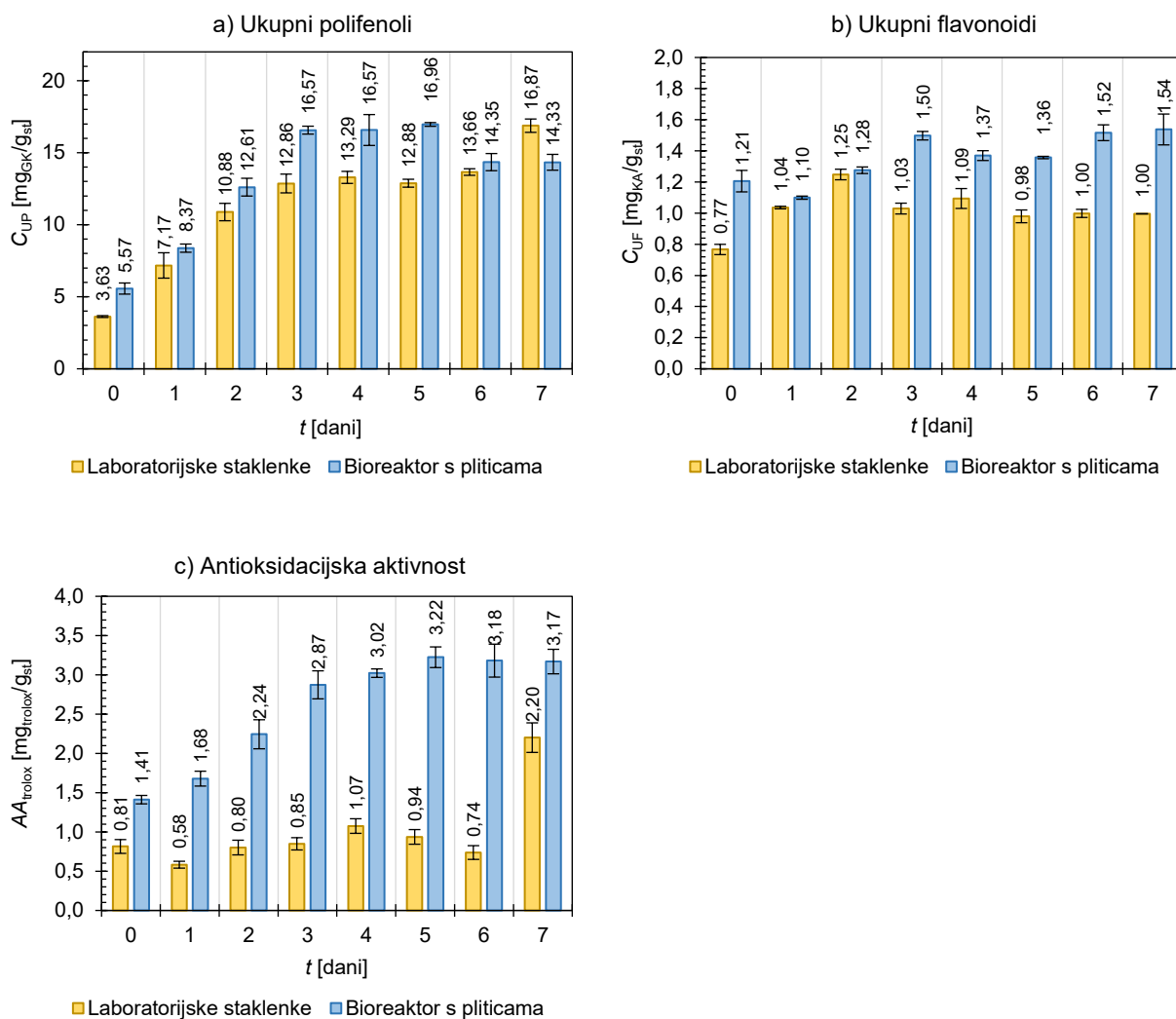
Maseni udio ukupnih flavonoida (**Slika 46b**) u bučinoj pogači iznosio je  $0,77 \pm 0,01$  mg<sub>KA</sub>/g<sub>st</sub>, dok je u uzorku izuzetog neposredno prije provedbe SSF procesa u bioreaktoru s pliticama iznosio



$1,21 \pm 0,07 \text{ mg}_{\text{KA}}/\text{g}_{\text{st}}$ . Tijekom procesa fermentacije mijenjao se maseni udio ukupnih flavonoida te je najveći maseni udio ukupnih flavonoida izmjeren provedbom SSF procesa u biorektoru s pliticama nakon sedmog dana fermentacije ( $1,54 \pm 0,10 \text{ mg}_{\text{KA}}/\text{g}_{\text{st}}$ ). Biološka obrada bučine pogače u laboratorijskim staklenkama rezultirala je povećanjem masenog udjela flavonoida do drugog dana procesa ( $1,25 \pm 0,03 \text{ mg}_{\text{KA}}/\text{g}_{\text{st}}$ ). U nastavku SSF procesa u laboratorijskim staklenkama došlo je do redukcije masenog udjela flavonoida.

Prema rezultatima dobivenim mjerenjem antioksidacijske aktivnosti u pripremljenim ekstraktima (**Slika 46c**) vidljivo je da je veća antioksidacijska aktivnost izmjerena u svim uzorcima izuzetim tijekom biološke obrade bučine pogače u biorektoru s pliticama. Tijekom SSF procesa u laboratorijskim staklenkama došlo je do povećanja antioksidacijske aktivnosti za 2,70 puta nakon sedmog dana fermentacije. Antioksidacijska aktivnost ekstrakta početnog uzorka izuzetog iz bioreaktora s pliticama iznosila je  $1,41 \pm 0,05 \text{ mg}_{\text{trolox}}/\text{g}_{\text{st}}$ . Tijekom provedbe SSF procesa antioksidacijska aktivnost ekstrakta se povećala za 2,29 puta uz maksimalnu vrijednost izmjerenu nakon petog dana fermentacije ( $3,22 \pm 0,13 \text{ mg}_{\text{trolox}}/\text{g}_{\text{st}}$ ).

Navedene promjene masenog udjela ukupnih polifenola, masenog udjela ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti u pripremljenim ekstraktima bučine pogače tijekom SSF procesa posljedica su već spomenutog djelovanja kompleksnog sustava hidrolitičkih enzima *T. lanuginosus*. Međutim, producirani hidrolitički enzimi mogu cijepati složene polisaharide (hemicelulozu) na jednostavnije oligomerne komponente koji u korištenom testu za mjerenje antioksidacijske aktivnosti (inhibicija DPPH•) mogu pokazati antioksidacijsko djelovanje. U istraživanju provedenog od grupe autora Mahmoud i sur. (2022) provedena je enzimska hidroliza ksilana pomoću sirove ksilanaze proizvedene uzgojem *Bacillus amyloliquifaciens* NRRL B-14393 fermentacijom na čvrstim nosačima. Proizvedeni ksiloigosaharidi (ksilobioza i ksilopentoza) pokazali su antioksidativnu aktivnost inhibicijom DPPH•. Navedeni rezultate ukazuju na činjenicu da izmjerene antioksidacijske aktivnosti u ekstraktima biološki obrađene bučine pogače ne moraju proizlaziti kao rezultat prisutnosti i/ili promjene koncentracije isključivo polifenolnih spojeva, nego i sintezi biološki aktivnih oligosaharida.



**Slika 46.** Maseni udio ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti u uzorcima biološki obrađene bučine pogače uzgojem *T. lanuginosus* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

#### 4.6.11. Rezultati određivanja masenog udjela topivog organskog ugljika i topivog dušika

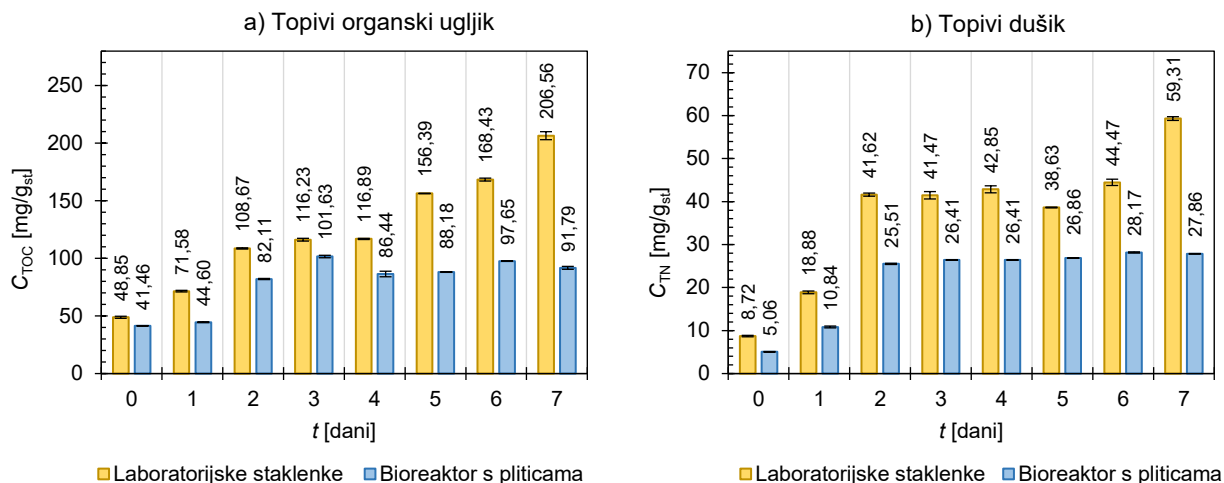
Kao što je navedeno u poglavlju 4.6.8., *T. lanuginosus* ima mogućnost asimilacije različitih spojeva koje koristi za svoj rast i metaboličku aktivnost. Iz navedenog razloga, provedeno je mjerenje masenog udjela topivog organskog ugljika i topivog dušika tijekom biološke obrade bučine pogače uzgojem *T. lanuginosus*.

Prema rezultatima (**Slika 47a**) maseni udio topivog organskog ugljika u uzorcima izuzetih prije provedbe SSF procesa u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama iznosili su  $48,58 \pm 0,89$  mg/g<sub>st</sub> i  $41,46 \pm 0,19$  mg/g<sub>st</sub>. Tijekom procesa fermentacije u laboratorijskim staklenkama

došlo je do povećanja masenog udjela te je najveći maseni udio topivog organskog ugljika izmjeren sedmi dan fermentacije uz povećanje za 4,23 puta te je iznosio  $206,56 \pm 3,47$  mg/g<sub>st</sub>. Biološkom obradom bučine pogače u bioreaktoru s pliticama najveći maseni udio topivog organskog ugljika izmjeren je nakon trećeg dana fermentacije uz povećanje za 2,45 puta te je iznosio  $101,63 \pm 1,07$  mg/g<sub>st</sub>. Nastavkom fermentacije u bioreaktoru s pliticama zabilježena je redukcija masenog udjela topivog organskog ugljika te je nakon sedmog dana fermentacije maseni udio iznosio  $91,79 \pm 1,25$  mg/g<sub>st</sub>.

Maseni udio topivog dušika (**Slika 47b**) u bučinoj pogači iznosio je  $8,72 \pm 0,17$  mg/g<sub>st</sub>. Tijekom SSF procesa u laboratorijskim staklenkama došlo je do povećanja masenog udjela topivog dušika. Najveći maseni udio topivog dušika izmjeren nakon sedmog dana SSF procesa te je iznosio  $59,31 \pm 0,43$  mg/g<sub>st</sub> (povećanje masenog udjela za 6,80 puta). Maseni udio topivog dušika u uzorku izuzetog neposredno prije provedbe SSF procesa u bioreaktoru s pliticama iznosio je  $5,06 \pm 0,07$  mg/g<sub>st</sub>. Tijekom biološke obrade bučine pogače u bioreaktoru s pliticama došlo je do povećanja masenog udjela topivog dušika. Maseni udio topivog dušika nije se značajno mijenjao od drugog do sedmog dana SSF procesa te je bio u rasponu od  $25,51 \pm 0,14$  mg/g<sub>st</sub> do  $28,17 \pm 0,13$  mg/g<sub>st</sub> (povećanje masenog udjela za 5,57 puta).

Sumirajući dobivene rezultate mjerenja masenog udjela topivog organskog ugljika i topivog dušika može se zaključiti da je nakon sedmog dana SSF procesa izmjerena veća koncentracija topivog organskog ugljika u uzorcima izuzetih nakon SSF procesa u laboratorijskim staklenkama za 2,25 puta, kao i veći maseni udio topivog dušika za 2,13 puta usporedno sa SSF procesom provedenog u bioreaktoru s pliticama. Povećanje masenog udjela topivog dušika i ugljika može se povezati sa sintezom i kompleksnim djelovanjem hidrolitičkih enzima *T. lanuginosus*. Štoviše, kada se mikroorganizmi nađu u uvjetima u kojima njihov preferirani izvor ugljika nedostaje ili je potrošen, dolazi do aktivacije gena i enzima koji kataboliziraju izvore ugljika koji su manje preferirani. Međutim, veći udio topljive organske tvari, tj. veće organsko opterećenje tijekom fermentacije, može dovesti do kataboličke represije, što dovodi do inhibicije sinteze željenih enzima (Nair i Sarma, 2021). Navedeno se može dovesti u korelaciju s rezultatima dobivenim mjerenjem volumne aktivnosti lipaze tijekom uzgoja *T. lanuginosus* u laboratorijskim staklenkama i u bioreaktoru s pliticama. Kao što je već opisano, izmjerena hidrolitička aktivnost TLL bila je niža tijekom proizvodnje lipaze u laboratorijskim staklenkama usporedno sa SSF procesom provedenog u bioreaktoru s pliticama, što može biti posljedica većeg organskog opterećenja provedbom proizvodnje lipaze u laboratorijskim staklenkama.



**Slika 47.** Maseni udio topivog organskog ugljika i topivog dušika u uzorcima biološki obrađene bučine pogače uzgojem *T. lanuginosus* u laboratorijskim staklenkama i bioreaktoru s pliticama

#### 4.6.12. Rezultati analize i procjene zdravstvene ispravnosti bučine pogače

Kako bi se ispitala mogućnost iskorištenja biološki obrađene bučine pogače u proizvodnji stočne hrane, provedena je analiza i procjena zdravstvene ispravnosti korištenog supstrata. Analize su provedene na uzorcima bučine pogače, bučine pogače nakon dodatka inokuluma pripremljenog uzgojem *T. lanuginosus* na repinim rezancima te biološki obrađene bučine pogače nakon tri dana fermentacije u bioreaktoru s pliticama.

Prema rezultatima prikazanim u **Tablici 27**, maseni udio nitrita u svim uzorcima bio je ispod granice detekcije ispitne metode. Maseni udio nitrata u početnom uzorku bučine pogače iznosio je 123 mg/kg. Nakon inokulacije i fermentacije maseni udio nitrata bio je ispod granice detekcije. Nitrati su dobro topljivi u vodi i imaju značajnu ulogu kao hranjive tvari za biljke koje se mogu koristiti za ishranu životinja. Međutim, nitrati u gastrointestinalnom traktu životinja prelaze u nitrite, što rezultira stvaranjem methemoglobina (MetHb) u krvi životinje. MetHb je molekula s vrlo ograničenom sposobnošću prijenosa kisika do tkiva. Stvaranje MetHb, kao rezultat reakcije između nitrita i oksihemoglobina, smatra se posrednikom većine štetnih učinaka kod životinja nakon izlaganja nitratima i nitritima. Iz navedenih razloga, Povjerenstvo za kontaminante u prehrambenom lancu (CONTAM) (EFSA) je definiralo maksimalne dozvoljene količine unosa nitrita i nitrata po kilogramu konzumenta (životinje) na temelju razina methemoglobina (MetHb) u krvi životinje koje ne bi izazvale kliničke znakove hipoksije (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2020). Uzimajući u obzir rezultate dobivene u ovom istraživanju i standarde koje je postavila EFSA, može se zaključiti da predloženi postupak biološke obrade ima

pozitivan učinak na poboljšanje kvalitete hrane za životinje, budući da je SSF proces rezultirao redukcijom masenog udjela nitrata ispod granice detekcije ispitne metode.

Iz podataka dobivenih mjerenjem bruto energije vidljivo je da inokulirana bučina pogača s repinim rezancima ima manju vrijednost bruto energije usporedno s početnim uzorkom bučine pogače. Budući da na kalorijsku vrijednost najveći utjecaj ima sadržaj masti (Merrill i Watt, 1955) dobiveni rezultati mogu se povezati s masenim udjelom masti izmjerenim u uzorcima. Prema rezultatima (poglavlje 4.6.3., **Slika 39**) maseni udio slobodnih masti u bučinoj pogači iznosio je  $9,50 \pm 0,35\%_{st}$ . Dodatkom inokuluma pripremljenog na repinim rezancima u bučinu pogaču, maseni udio slobodnih masti iznosio je  $6,37 \pm 0,40\%_{st}$ . Nadalje, maseni udio slobodnih masti u uzorku smanjio se nakon trećeg dana fermentacije te je iznosio  $3,68 \pm 0,27\%_{st}$  što je rezultiralo redukcijom kalorijske vrijednosti biološki obrađene bučine pogače.

Koncentracija amonijskog dušika u početnom uzorku bučine pogače iznosila je 0,15%, odnosno 0,19% nakon inokulacije bučine pogače repinim rezancima. Navedeno povećanje koncentracije amonijskog dušika nakon inokulacije može se povezati s dodatkom fermentiranih repinih rezanaca u svježju bučinu pogaču, budući da su rezultati pokazali da tijekom fermentacije dolazi do povećanja koncentracije amonijskog dušika. Nakon trećeg dana fermentacije, koncentracija amonijskog dušika iznosila je 0,65%. Poznata je činjenica da amonijski dušik može nastati denitrifikacijom nitrata (čija je redukcija zabilježena tijekom procesa fermentacije) do molekuskog dušika te njegovom fiksacijom u amonijski dušik djelovanjem dušičnih bakterija (Cole i Brown, 1980). Također, amonijski dušik može nastati razgradnjom aminokiselina i polifenola te mjerenjem koncentracije amonijskog dušika moguće je pratiti tijekom procesa fermentacije i kvalitete fermentiranog proizvoda (Hue, 2014) čime se može zaključiti da je do promjene masenog udjela amonijskog dušika došlo kao posljedica metaboličke aktivnosti radnog mikroorganizma.

Koncentracija organskih hlapivih kiselina mjerena je tijekom procesa fermentacije. Rezultati su izraženi u postotku ukupnog udjela pojedinačnih kiselina. U početnom uzorku bučine pogače udio octene kiseline iznosio je 12,56%, maslačna kiselina nije detektirana dok je udio mliječne kiseline iznosio 87,44%. Inokulacijom bučine pogače repinim rezancima, detektirana je prisutnost samo octene kiseline te se omjer organskih hlapivih kiselina promijenio nakon trećeg dana fermentacije kao posljedica metaboličke aktivnosti radnog mikroorganizma (Vandenberghé i sur., 2018).

**Tablica 27.** Rezultati provedenih kemijskih ispitivanja u uzorcima bučine pogače

Parametar ispitivanja	Mjerna jedinica	Bučina pogača	Bučina pogača + inokulum	SSF 3D
Nitriti	mg/kg	< 50,0	< 50,0	< 50,0
Nitrati	mg/kg	123	< 50,0	< 50,0
Bruto energija	kJ/kg	19327	18050	17391
Amonijski dušik	%	0,15	0,19	0,65
Octena kiselina	%	12,56	100	31,39
Maslačna kiselina	%	0	0	0
Mliječna kiselina	%	87,44	0	68,61

Prisutnost opasnih kemijskih kontaminanata ili nepoželjnih tvari u hrani i stočnoj hrani često je neizbježna jer se kontaminacija može dogoditi u svim fazama rukovanja i obrade, “od polja do stola“ (Alexander i sur., 2012). Ovisno o podrijetlu, kontaminanti koji se nalaze u hrani mogu se podijeliti na: (i) prirodne kontaminante (mikotoksini, enterotoksini i alkaloidi); (ii) okolišne kontaminante (teški metali, dioksini, policiklički aromatski ugljikovodici (PAH), organofosforni i organoklorni spojevi, uključujući poliklorirane bifenile (PCB) i pesticide); te (iii) kontaminante koji nastaju obradom hrane, odnosno procesni kontaminanti (klorpropanoli, akrilamid, ostaci sredstava za čišćenje, PCB, PAH). Prisutnost kontaminanata u hrani može imati negativan utjecaj na zdravlje potrošača te je neophodno provoditi monitoring kontaminanata prema propisanim zakonskim regulativama (Silano i Silano, 2017).

Rezultati mjerenja koncentracija biogenih i teških metala prikazani su u **Tablici 28**. Fosfor je bitan element za sve oblike života, od jednostaničnih do višestaničnih organizama. Neophodan je za pravilan rast mišića i formiranje jajne stanice, važna je komponenta nukleinskih kiselina, genetskog koda i fosfolipida tekofaktor u mnogim enzimskim sustavima (Li i sur., 2016). Formulacije korištene za ishranu životinja obično zahtijevaju dodatak anorganskog fosfora zbog niskih koncentracija i niske biološke dostupnosti ukupnog fosfora u sastojcima stočne hrane od žitarica. Međutim, prekomjerne količine anorganskog fosfora u stajskoj gnojnici doprinose onečišćenju jezera, potoka i močvara što dovodi do eutrofikacije površinskih voda (Li i sur., 2016). Bučine sjemenke izuzetno su bogat izvor minerala. Rezultati istraživanja provedenog od grupe autora Seymen i sur. (2016) pokazali su da su najzastupljeniji minerali u bučnim sjemenkama kalij (2704,75 – 1033,63 mg/kg), fosfor (3569,690 – 9108,835 mg/kg) i magnezij (1275,15 – 3938,16 mg/kg). Međutim, fosfor prisutan u sjemenkama buče nalazi se u obliku fitata čime je značajno smanjena biološka dostupnost fosfora. Nadalje, problem s fitatima u hrani je taj što mogu

vezati druge minerale u probavnom traktu životinje i tako smanjiti njihovu bioraspoloživost (Elinge i sur., 2012). Kako bi se riješio navedeni problem, dodavanje mikrobnog enzima fitaze u stočnu hranu može smanjiti antinutritivni učinak fitata, poboljšati probavljivost fosfora, kalcija i aminokiselina te smanjiti negativne učinke izlučivanja anorganskog fosfora u okoliš (Dersjant-Li i sur., 2015). Kao što je ranije navedeno u ovom istraživanju, *T. lanuginosus* tijekom svoje metaboličke aktivnosti producira veliki broj izvanstaničnih enzima, između ostalih i enzim fitazu (Berikten i Kivanc, 2014). Istraživanje primjene fitaze iz *T. lanuginosus* rezultiralo je visokom redukcijom masenog udjela fitata u testiranom uzorku (Makolomakwa i sur., 2017). Prema dobivenim rezultatima u ovom istraživanju vidljivo je da se udio fosfora nakon trećeg dana fermentacije smanjio sa 1,9% na 1,3% što ukazuje na pretpostavku da je tijekom SSF procesa došlo do redukcije fitata te oslobađanja biogenog fosfora kojega je radni mikroorganizam koristio tijekom svog rasta i metaboličke aktivnosti. Odnosno, može se pretpostaviti da je tijekom SSF procesa došlo do poboljšanja biološke raspoloživosti fosfora.

Mjerenjem masenog udjela teških metala (željezo, olovo, kadmij i arsen) vidljivo je da je tijekom SSF procesa došlo do povećanja koncentracije navedenih elemenata kao posljedica kontaminacije tijekom pripreme uzorka (mljevenje u laboratorijskom mlinu, provedbom SSF procesa na metalnoj plitici). Prema preporukama FEEDAP Panela (*The Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed*) maksimalan sadržaj željeza u potpunim krmivima za goveda i perad iznosi 450 mg/kg, te za kućne ljubimce 600 mg/kg (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2016). Izmjereni maseni udio željeza u biološki obrađenoj bučinoj pogači iznosi 355 mg/kg. Direktiva 2002/32/EZ Europskog parlamenta i vijeća (7. svibanj 2002.) o nepoželjnim tvarima u hrani za životinje koju je izmijenila Uredba Komisije (EU) 2019/1869 7. studenoga 2019. (službeni list broj: L 289, stranica: 32, datum: 8.11.2019) propisala je maksimalno dozvoljene koncentracije za navedene metale u hrani za životinje. Izmjereni maseni udio olova, kadmija i arsena u biološki obrađenoj bučinoj pogači nakon SSF procesa iznosio je 0,40 mg/kg, 0,24 mg/kg i 0,24 mg/kg. Prema Direktivi, maksimalno dozvoljene koncentracije za olovo, kadmij i arsen u hrani za životinje (krmiva) iznose 10 mg/kg, 1 mg/kg i 2 mg/kg. Sukladno dobivenim rezultatima, maseni udio ispitanih teških metala nalazio se unutar dozvoljenih granica propisanim za hranu za životinje.

Prema rezultatima ispitivanja prisutnosti nepoželjnih tvari (mikotoksina, alkaloida, PCB-a i PAH-ova) u uzorcima bučine pogače prikazanih u **Tablicama 29, 30, i 31**, ispitivane tvari bile su ispod granice detekcije ispitne metode. Dobiveni rezultati i iznesene činjenice potvrđuju superiornost

predložene biološke metode poboljšanja kemijskog sastava bučine pogače kao visokokvalitetnog pripravka koji se može koristiti u proizvodnji stočne hrane.

**Tablica 28.** Rezultati ispitivanja udjela metala i metaloida u uzorcima bučine pogače

Parametar ispitivanja	Mjerna jedinica	Peleti buče	Peleti buče + inokulum	SSF 3D
Fosfor	%	1,9	1,3	1,3
Kalcij	mg/kg	1069	3445	3920
Kalij	mg/kg	17726	16779	13616
Željezo	mg/kg	215	356	355
Olovo	mg/kg	0,075	0,37	0,40
Kadmij	mg/kg	0,038	0,20	0,24
Arsen	mg/kg	0,016	0,058	0,24

**Tablica 29.** Rezultati ispitivanja udjela nepoželjnih tvari (mikotoksina) u uzorcima bučine pogače

Parametar ispitivanja	Mjerna jedinica	Peleti buče	Peleti buče + inokulum	SSF 3D
Aflatoksin B1	mg/kg	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Aflatoksin B2	mg/kg	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005
Aflatoksin G1	mg/kg	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Aflatoksin G2	mg/kg	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Aflatoksini ukupni	mg/kg	< 0,0003	< 0,0003	< 0,0003
Deoksinivalenol	mg/kg	< 0,20	< 0,20	< 0,20
Fumonizin B1	mg/kg	< 0,20	< 0,20	< 0,20
Fumonizin B2	mg/kg	< 0,15	< 0,15	< 0,15
Fumonizini	mg/kg	< 0,30	< 0,30	< 0,30
Zearalenon	mg/kg	< 0,030	< 0,030	< 0,030
T-2 toksin	mg/kg	< 0,010	< 0,010	< 0,010
HT-2 toksin	mg/kg	< 0,010	< 0,010	< 0,010
Zbroj T-2 i HT-2	mg/kg	< 0,020	< 0,020	< 0,020
Oktratoksin A	mg/kg	< 0,001	< 0,001	< 0,001



**Tablica 30.** Rezultati ispitivanja udjela nepoželjnih tvari (alkaloidi) u uzorcima bučine pogače

Parametar ispitivanja	Mjerna jedinica	Peleti buče	Peleti buče + inokulum	SSF 3D
<b>ERGOT ALKALOIDI</b>				
Egokristinin	µg/kg	< 10	< 10	< 10
Egokristin	µg/kg	< 10	< 10	< 10
Ergotaminin	µg/kg	< 10	< 10	< 10
Ergotamin	µg/kg	< 10	< 10	< 10
Egokriptinin	µg/kg	< 10	< 10	< 10
á Ergokriptin	µg/kg	< 10	< 10	< 10
Egokorninin	µg/kg	< 10	< 10	< 10
Egokornin	µg/kg	< 10	< 10	< 10
Ergozinin	µg/kg	< 10	< 10	< 10
Ergozin	µg/kg	< 10	< 10	< 10
Ergometrinin	µg/kg	< 10	< 10	< 10
Ergometrin	µg/kg	< 10	< 10	< 10
Ukupni ergot alkaloidi	µg/kg	< 120	< 120	< 120
<b>TROPAN ALKALOIDI</b>				
Atropin	µg/kg	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Skopolamin	µg/kg	< 1,0	< 1,0	< 1,0

**Tablica 31.** Rezultati ispitivanja udjela nepoželjnih tvari (PCB i PAH) u uzorcima bučine pogače

Parametar ispitivanja	Mjerna jedinica	Peleti buče	Peleti buče + inokulum	SSF 3D
<b>POLIKLORIRANI BIFENILI (PCB)</b>				
PCB ukupni	mg/kg	< 0,035	< 0,035	< 0,035
PCB 28	mg/kg	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
PCB 52	mg/kg	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
PCB 101	mg/kg	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
PCB 118	mg/kg	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
PCB 138	mg/kg	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
PCB 153	mg/kg	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
PCB 180	mg/kg	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050
<b>POLICIKLIČKI AROMATSKI UGLJIKOVODICI (PAH)</b>				
Benz(a)antracen	mg/kg	< 0,0050	< 0,0050	< 0,0050

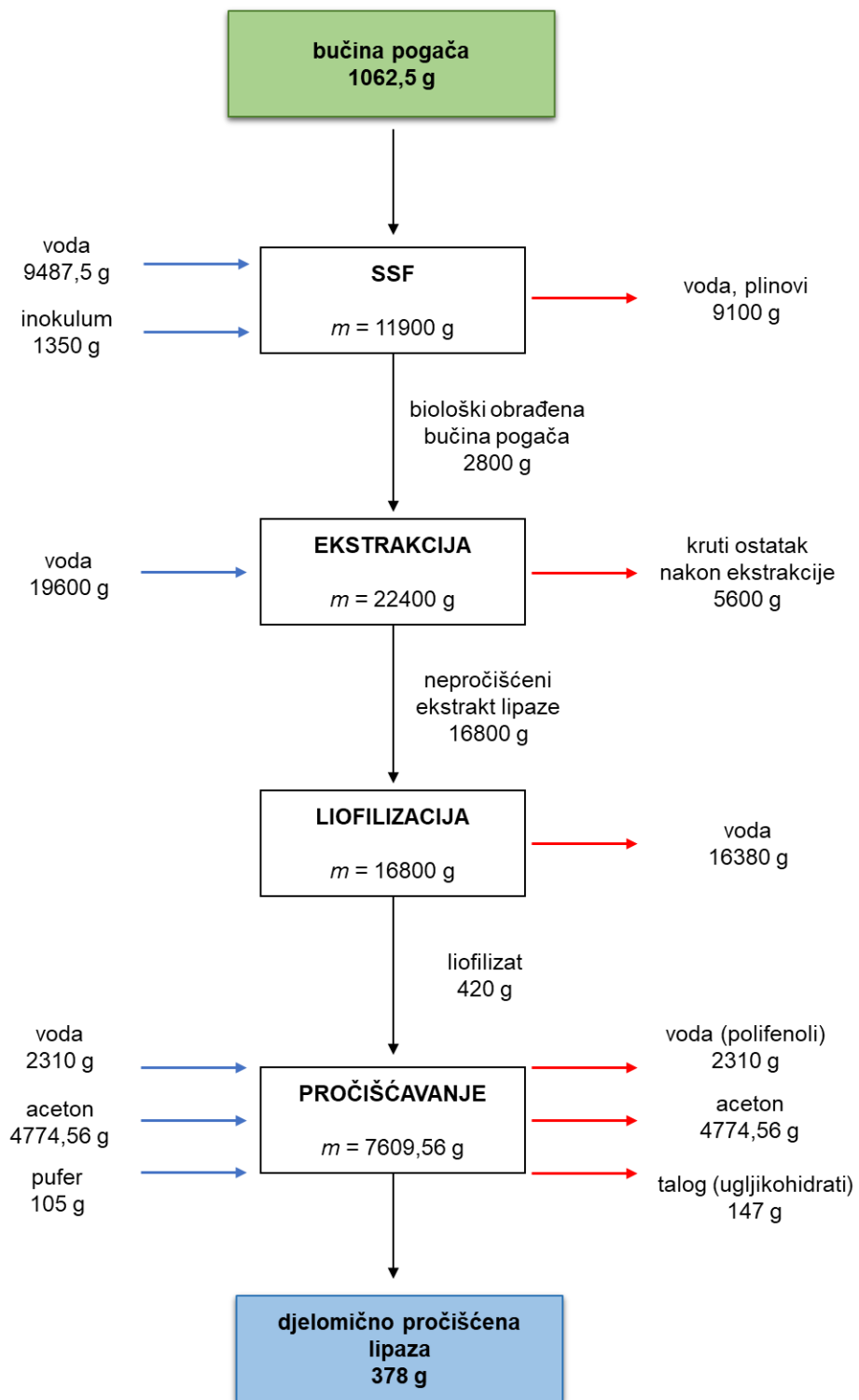
Benzo(a)piren	mg/kg	0,012	0,0087	0,0092
Krizen	mg/kg	0,0092	0,0092	0,0092
Benzo(b)fluoranten	mg/kg	0,0092	0,0060	0,0067
Zbroj benzo(a)pirena, benz(a)antracena, benzo(b)fluorantena i krizena	mg/kg	0,019	0,015	0,016

#### 4.7. REZULTATI PROCJENE ODRŽIVOSTI PROCESA PROIZVODNJE I PROČIŠĆAVANJA LIPAZE

Da bi se provela procjena održivosti predloženog procesa proizvodnje i pročišćavanja lipaze temeljena na konceptu biorafinerije, postavljena je bilanca mase (**Slika 48**). Analizirane su četiri osnovne faze procesa: proizvodnja lipaze (SSF), ekstrakcija lipaze, liofilizacija ekstrakta i pročišćavanje lipaze. Mase korištenih procesnih struja prikazane su kao ulazne veličine plavim strelicama te kao izlazne veličine (otpad) crvenim strelicama.

U svrhu procjene održivosti procesa, najprije je proveden izračun *E-faktora*. *E-faktor* daje uvid u količinu otpada generiranog tijekom proizvodnje željenog produkta. Idealan *E-faktor* iznosi 0. Viši *E-faktor* sugerira na procese u kojima dolazi do određene akumulacije otpada. Međutim, dobivene vrijednost za *E-faktor* mogu se tolerirati u ovisnosti o vrijednosti, čistoći i količini dobivenog produkta te o broju stupnjeva procesa. Na primjer, prihvatljivi *E-faktor* za industrijsku proizvodnju kemikalija (kao što su plastika i polimeri) u količinama od deset tisuća do milijun tona godišnje obično je između 1 kg/kg i 5 kg/kg, te se takvi procesi obično provode u jednom ili dva stupnja. Za proizvodnju visokovrijednih i posebnih kemikalija (premazi, elektroničke komponente, farmaceutske sirovine), čija godišnja proizvodnja doseže desetke tisuća tona godišnje, dopuštena vrijednost *E-faktora* može biti reda veličine od 5 kg/kg do 50 kg/kg, ako je vrijednost proizvoda dovoljno visoka da opravda troškove obrade i zbrinjavanja nastalog otpada. Takvi procesi obično se provode u tri do četiri stupnja. U farmaceutskoj industriji (proizvodnja antibiotika, lijekova, cjepiva) s godišnjom proizvodnjom od 1000 tona, prihvatljiva vrijednost *E-faktora* može biti od 25 kg/kg do oko 100 kg/kg budući da proizvodnja farmaceutika zahtjeva visoku čistoću produkta te se proizvodnja provodi u više od 6 stupnjeva (Roschangar i sur., 2015).

Osim *E-faktora*, izračunate su *MI* i *PMI* vrijednosti da bi se dobio podatak o količini sirovina potrebnih za proizvodnju bioprodukata u predloženom procesu.



Slika 48. Bilanca mase procesa proizvodnje i pročišćavanja lipaze

U prvoj fazi procjene održivosti izračunat je E-faktor za svaku fazu proizvodnje i procesa pročišćavanja lipaze kako bi se procijenilo u kojoj fazi dolazi do najvećeg nakupljanja otpada. Prema rezultatima prikazanim u **Tablici 32**, najveći *E-faktor* izračunat je za proces koncentriranja ekstrakta enzima postupkom liofilizacije (39,00 g/g). Niža vrijednost *E-faktora* izračunata je za proces pročišćavanja lipaze (19,13 g/g). Najmanje vrijednosti dobivene su za proces fermentacije (3,25 g/g) i proces ekstrakcije lipaze (0,33 g/g). Prema rezultatima, vidljivo je da se najveća akumulacija otpada javlja tijekom procesa liofilizacije enzima. Međutim, ako se uzme u obzir činjenica da je tijekom navedenog procesa došlo do akumulacije otpada u obliku vode uklonjene postupkom liofilizacije, može se pretpostaviti da nastala otpadna voda ne predstavlja ekološko opterećenje. Nadalje, izračunati *E-faktor* za proces pročišćavanja lipaze može se reducirati ako se uzme u obzir činjenica da masu akumuliranog otpada čine frakcije koje se mogu naknadno reciklirati (acetone) ili koristiti kao izvor potencijalno visokovrijednih produkata (koncentrirani polifenoli u vodi i ugljikohidrati u talogu).

**Tablica 32.** *E-faktor* izračunat za pojedinačne faze proizvodnje i pročišćavanja lipaze

Faza proizvodnje	$m_{\text{otpad}}$ [g]	$m_{\text{produkt}}$ [g]	E-faktor [g/g]
SSF	9100	2800	3,25
Ekstrakcija	5600	16800	0,33
Liofilizacija	16380	420	39,00
Pročišćavanje	7231,56	378	19,13

U drugom koraku provedena je procjena održivosti cjelokupnog procesa proizvodnje i pročišćavanja lipaze na temelju *E-faktora*. Izračuni su provedeni za tri različita slučaja (**Tablica 33**). U prvom slučaju, masa produkta predloženog procesa odnosi se samo na masu dobivene djelomično pročišćene lipaze, dok su sve ostale struje uzete u izračun kao otpad. Prema dobivenim rezultatima *E-faktor* iznosi 101,35 g/g. U drugom slučaju, masa produkta predloženog procesa odnosi se na masu dobivene pročišćene lipaze i masu krutog ostataka biološki obrađene bučine pogače zaostale nakon procesa ekstrakcije lipaze vodom. Zaostali kruti ostatak može se koristiti za stočnu ishranu te u ovom procesu ne predstavlja otpadnu struju. Nakon ponovljenih izračuna, *E-faktor* iznosi 5,47 g/g. U trećem slučaju, masa produkta uzeta za izračun ista je kao u drugom slučaju (glavni produkti procesa su djelomično pročišćena TLL i kruti ostatak biološki obrađene bučine pogače zaostao nakon ekstrakcije). Masu otpada čine otpadne struje iz procesa fermentacije i liofilizacije. Zaostala masa nakon provedenog procesa pročišćavanja TLL nije uzeta

u izračun budući da se aceton može reciklirati i ponovo koristiti u procesu pročišćavanja lipaze, dok preostale frakcije ne predstavljaju nužno otpad ali ne i glavne produkte predloženog procesa. U tom slučaju, *E-faktor* iznosi 4,26 g/g. U četvrtom slučaju, ako glavni produkti predloženog procesa predstavljaju djelomično pročišćena TLL, kruti ostatak biološki obrađene bučine pogače zaostao nakon ekstrakcije lipaze, te frakcije zaostale nakon pročišćavanja lipaze (koncentrat polifenola u vodi i ugljikohidrati u obliku taloga), a masu otpada čine otpadne struje procesa fermentacije i liofilizacije, u tom slučaju *E-faktor* iznosi 3,02 g/g.

**Tablica 33.** *E-faktor* izračunat za različite slučajeve proizvodnje i pročišćavanja lipaze

Slučaj	$m_{\text{otpad}}$ [g]	$m_{\text{produkt}}$ [g]	<i>E-faktor</i> [g/g]
1	38311,56	378	101,35
2	32711,56	5978	5,47
3	25480	5978	4,26
4	25480	8435	3,02

Da bi se procijenila potrebna količina ulaznih sirovina u svrhu proizvodnje željenih produkata, izračunata je *MI* vrijednost za tri različita slučaja (**Tablica 34**). Za svaki promatrani slučaj korištena je jednaka masa ulaznih procesnih struja i ulaznih sirovina ( $m_{\text{proces}}$  = masa bučine pogače + masa inokuluma + masa acetona + masa pufera). Za izračun *MI* vrijednosti, masa korištene vode ne uzima se u obzir. Za prvi slučaj, masa produkta odnosi se samo na masu dobivene djelomično pročišćene TLL. U tom slučaju, *MI* vrijednost iznosi 19,29 g/g. U drugom slučaju, masa produkta odnosi se na masu djelomično pročišćene TLL i krutog ostataka biološki obrađene bučine pogače zaostale nakon ekstrakcije lipaze. Prema izračunu, došlo je do redukcije *MI* vrijednost na 1,22 g/g. U trećem slučaju, masa produkta odnosi se na masu djelomično pročišćene TLL, krutog ostatka biološki obrađene bučine pogače zaostale nakon ekstrakcije lipaze, te frakcije zaostale nakon pročišćavanja lipaze (koncentrat polifenola u vodi i ugljikohidrati u obliku taloga). U navedenom slučaju, *MI* vrijednost iznosi 0,86 g/g.

**Tablica 34.** *MI* vrijednost izračunata za različite slučajeve proizvodnje i pročišćavanja lipaze

Slučaj	$m_{\text{proces}}$ [g]	$m_{\text{produkt}}$ [g]	<i>MI</i> [g/g]
1	7292,06	378	19,29
2	7292,06	5978	1,22
3	7292,06	8435	0,86

Budući da u svrhu izračuna *MI* vrijednosti nije uračunata masa vode proveden je izračun *PMI* vrijednosti koji uzima u obzir i masu vode. Kao za *MI* vrijednost, izračunata je *PMI* vrijednost za tri različita slučaja (**Tablica 35**). U prvom slučaju *PMI* vrijednost iznosila je 102,35 g/g, u drugom slučaju 6,47 g/g te u trećem slučaju 4,59 g/g.

**Tablica 35.** *PMI* vrijednost izračunata za različite slučajeve proizvodnje i pročišćavanja lipaze

Slučaj	$m_{\text{proces}}$ [g]	$m_{\text{produkt}}$ [g]	<i>PMI</i> [g/g]
1	38689,56	378	102,35
2	38689,56	5978	6,47
3	38689,56	8435	4,59

Prema dobivenim rezultatima za *E-faktor*, *MI* vrijednost i *PMI* vrijednost može se zaključiti da se predloženi proces proizvodnje bioproducta rangira u kategoriju proizvodnje finih kemikalija. Uzevši u obzir činjenicu da je *E-faktor* proporcionalan broju stupnjeva procesa, vidljivo je da dobivena vrijednost *E-faktora* odgovara literaturnim podacima budući da je predloženi proces proveden u četiri stupnja. Nadalje, kako sam koncept biorafinerije nalaže proizvodnju više od jednog bioproducta u proizvodnom lancu, u ovom istraživanju potvrđena je činjenica da se višestrukim iskorištavanjem sirovine značajno utječe na redukciju akumulacije otpada. Navedena činjenica potvrđena je redukcijom *E-faktora*, *MI* vrijednosti i *PMI* vrijednosti za promatrane slučajeve u kojima su nusprodukti u predloženom procesu korišteni kao visokovrijedni bioproducti.

## **5. ZAKLJUČCI**

Nakon provedene prve faze eksperimentalnog istraživanja (razvoj novog spektrofotometrijskog testa za mjerenje aktivnosti TLL u reakciji hidrolize *p*NP-palmitata), doneseni su sljedeći zaključci:

- Povećanje koncentracije TLL u vodenom mediju dovodi do smanjenja hidrolitičke aktivnosti lipaze zbog stvaranja bimolekularnih proteinskih agregata.
- Maksimalna hidrolitička aktivnost lipaze izmjerena je pripremom reakcijske smjese u TRIS-HCl puferu, 50 mmol/dm<sup>3</sup>, pH 9.
- Provedbom reakcije enzimski katalizirane hidrolize *p*NP-palmitata, zaključeno je da je TLL stabilan protein u prisutnosti različitih organskih otapala korištenih za pripremu otopine supstrata. Maksimalna hidrolitička aktivnost lipaze izmjerena je pri volumnom udjelu acetonitrila u reakcijskoj smjesi od 4% (v/v).
- Maksimalna hidrolitička aktivnost TLL izmjerena je emulgiranjem supstrata u reakcijskoj smjesi uz upotrebu arapske gume (0,3% w/v) kao emulgatora.
- Predložena su dva kinetička modela hidrolize supstrata te su procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za Michaelis-Menteničin kinetički model ( $K_m = 0,173 \pm 0,058$  mmol/dm<sup>3</sup>,  $V_m = 266593 \pm 26285$  U/cm<sup>3</sup>) i Hillov kinetički model ( $K_m = 0,173 \pm 0,010$  mmol/dm<sup>3</sup>,  $V_m = 222781 \pm 9112$  U/cm<sup>3</sup>). Usporedbom modela pokazano je da Hillov kinetički model bolje opisuje eksperimentalne podatke biokatalitičke hidrolize supstrata pomoću TLL.

U drugoj fazi eksperimentalnog istraživanja provedena je optimizacija uvjeta procesa proizvodnje TLL primjenom RSM metode te su doneseni sljedeći zaključci:

- Uzgojem *T. lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima potvrđena je mogućnost provedbe biološke obrade bučine pogače s ciljem proizvodnje TLL.
- Statistička analiza utjecaja procesnih parametara pokazala je da ispitivani parametri (početna masa supstrata, udio inokuluma, udio vlage, vrijeme fermentacije, temperatura fermentacije) imaju značajan utjecaj na tijek SSF procesa, pri čemu najveći utjecaj na tijek procesa proizvodnje TLL ima temperatura.
- "*P*-vrijednost modela" < 0,0001 i  $R^2 = 0,8282$  impliciraju na statističku značajnost predloženog modela u predikciji proizvodnje TLL uzgojem *T. lanuginosus* tijekom SSF procesa na bučinoj pogači.



- Validacija dobivenog matematičkog modela pokazala je dobro slaganje između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrijednosti aktivnosti lipaze s predikcijom modela uz 95,113% točnosti.
- Maksimalna volumna aktivnost TLL zabilježena je nakon drugog dana SSF procesa ( $15,77 \text{ U/cm}^3$ ) uzgojem *T. lanuginosus* na  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- Usporedbom rezultata elektroforeze uzorka djelomično pročišćenog enzimskog pripravka i komercijalne TLL potvrđena je prisutnost lipaze u ekstraktu biološki obrađene bučine pogače.
- Karakterizacijom sirovog enzimskog ekstrakta potvrđena je termostabilnost proizvedene TLL s maksimalnom hidrolitičkom aktivnošću pri  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dobiveni enzimski pripravak stabilan je tijekom skladištenja na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  te u prisutnosti organskih otapala i metalnih iona.

Sljedeći zaključci izvedeni su nakon provedenog procesa uvećanja mjerila proizvodnje TLL, pročišćavanja i testiranja nepročišćene i djelomično pročišćene TLL u reakciji biotransformacije biljnih ulja:

- Upotreba bioreaktora s pliticama i repinih rezanaca kao lignoceluloznog supstrata za proizvodnju inokuluma pokazala se učinkovitom strategijom za uvećanje mjerila proizvodnje lipaze.
- Provedbom SSF procesa u bioraktoru s pliticama maksimalna volumna aktivnost TLL izmjerena je četvrti dan fermentacije ( $58,55 \text{ U/cm}^3$ ).
- RMS metodom optimizirani su uvjeti reakcije hidrolize suncokretovog ulja ( $w_{\text{ulje}} = 37,69\%$ ,  $w_{\text{enzim}} = 7\%$ ,  $\text{pH} = 7,31$ ) provedbom eksperimenata prema Box-Behnkenovom planu pokusa.
- Statistička analiza utjecaja procesnih parametara pokazala je da ispitivani parametri imaju značajan utjecaj na hidrolizu suncokretovog ulja. "*P*-vrijednost modela"  $< 0,0001$  i  $R^2 = 0,9662$  impliciraju na statističku značajnost predloženog modela.
- Primjenom optimiziranih reakcijskih uvjeta u hidrolizi drugih biljnih ulja kao modelnih supstrata (omegol ulje, hladno prešano ulje konoplje, ekstra djevičansko maslinovo ulje, djevičansko bučino ulje, hladno prešano laneno ulje, rafinirano kokosovo ulje) zaključeno je da proizvedena TLL pokazuje široku supstratnu specifičnost.
- Pročišćavanje TLL iz sirovog liofiliziranog enzimskog ekstrakta precipitacijom u dvostupanjskom postupku s acetonom rezultiralo je značajnim povećanjem hidrolitičke aktivnosti TLL s faktorom pročišćavanja od 10,91. Volumna i specifična aktivnosti TLL prije

pročišćavanja iznosili su 1,19 U/cm<sup>3</sup> i 0,68 U/mg<sub>protein</sub>. Volumna i specifična aktivnosti TLL nakon pročišćavanja iznosili su 304,87 U/cm<sup>3</sup> i 7,42 U/mg<sub>protein</sub>.

- Razvijena metoda pročišćavanja TLL uključuje odvajanje dviju visokovrijednih frakcija, složenih ugljikohidrata i polifenola, što omogućuje proširenje opsega predloženog koncepta biorafinerije.
- Djelomično pročišćena TLL pokazala je visoku hidrolitičku aktivnost u hidrolizi otpadnog suncokretovog ulja ( $X_{\text{hidroliza}} > 99\%$ ,  $t = 36$  h), što dovodi do zaključka da predloženi proces proizvodnje i primjene TLL u valorizaciji otpada industrije biljnih ulja ima veliki potencijal.

Završna faza eksperimentalnog rada uključivala je provođenje kemijske analize bučine pogače prije, tijekom i nakon SSF procesa te ocjenu održivosti predloženog procesa. Kao rezultat toga, doneseni su sljedeći zaključci:

- Biološkom obradom poboljšan je kemijski sastav i kvaliteta bučine pogače. Pokazalo se da *T. lanuginosus* proizvodi složeni enzimski sustav mijenjajući kemijski sastav supstrata tijekom SSF procesa.
- Provedene analize su pokazale da su teški metali prisutni u dopuštenim granicama u uzorcima biološki obrađene bučine pogače.
- Nakon biološke obrade bučine pogače nisu detektirane nepoželjne tvari (mikotoksini, alkaloidi, PCB i PAH) te je došlo do redukcije udjela nepoželjnih nitrata. Na temelju navedenog može se zaključiti da biološki obrađena bučina pogača može biti sirovina za proizvodnju poboljšanog dodatka hrani ili hrani za životinje.
- Nakon procjene predloženog procesa biološke obrade bučine pogače (*Green Metrics*:  $E\text{-faktor} = 3,02$  g/g,  $MI = 0,86$  g/g,  $PMI = 4,59$  g/g), zaključeno je da je razvijen održivi proces proizvodnje visokovrijednih bioprodukata (enzima lipaze i bučine pogače unaprijeđene kvalitete kao potencijalne stočne hrane) čime je zaokružen proces valorizacije lignocelulozne biomase, ostvaren "zero-waste" pristup i potvrđen predloženi koncept biorafinerije.

## **6. LITERATURA**

- Abbas HM, Foda MS, Kassem JM, Bayomi HM, Moharam ME: Production of white soft cheese using fungal coagulant produced by solid state fermentation technique. *World Applied Sciences Journal* 25(6):939–944, 2013.
- Abbou A, Kadri N, Debbache N, Dairi S, Remini H, Dahmoune F, ... Madani K: Effect of precipitation solvent on some biological activities of polysaccharides from *Pinus halepensis* Mill. seeds. *International Journal of Biological Macromolecules* 141:663–670, 2019.
- Abdelmoez W, Mostafa NA, Mustafa A: Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. *Journal of Cleaner Production* 59:290–297, 2013.
- Abu Yazid N, Barrena R, Komilis D, Sánchez A: Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review. *Sustainability* 9(2):224, 2017.
- Adebar N, Choi JE, Schober L, Miyake R, Iura T, Kawabata H, Gröger H: Overcoming work-up limitations of biphasic biocatalytic reaction mixtures through liquid-liquid segmented flow processes. *ChemCatChem* 11(23):5788–5793, 2019.
- Adinarayana K, Prabhakar T, Srinivasulu V, Anitha Rao M, Jhansi Lakshmi P, Ellaiah P: Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum*. *Process Biochemistry* 39(2):171–177, 2003.
- Aditiya HB, Mahlia TMI, Chong WT, Nur H, Sebayang AH: Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 66:631–653, 2016.
- Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin DB: Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology Advances* 29(6):675–685, 2011.
- Aggelopoulos T, Katsieris K, Bekatorou A, Pandey A, Banat IM, Koutinas AA: Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chemistry* 145:710–716, 2013.
- Akanbi TO, Adcock JL, Barrow CJ: Selective concentration of EPA and DHA using *Thermomyces lanuginosus* lipase is due to fatty acid selectivity and not regioselectivity. *Food Chemistry* 138(1):615–620, 2013.
- Akande TO, Odunsi AA, Akinfala EO: A review of nutritional and toxicological implications of castor bean (*Ricinus communis* L.) meal in animal feeding systems. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100(2):201–210, 2016.
- Alawad I, Ibrahim H: Pretreatment of agricultural lignocellulosic biomass for fermentable sugar: Opportunities, challenges, and future trends. *Biomass Conversion and Biorefinery* 1–29, 2022.
- Alexander J, Benford D, Boobis A, Eskola M, Fink-Gremmels J, Fürst P, ... van Leeuwen R: Risk assessment of contaminants in food and feed. *EFSA Journal* 10(10):s1004, 2012.
- Al-Haidari AMD, Khudhair SH, Alsaadawi IS: Extraction and purification of lipases enzyme from germinating seeds of four crops. *Iraqi Journal of Science* 2182–2188, 2020.
- Ali HKQ, Zulkali MMD: Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: a review. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 25(2):255–266, 2011.

- Ali N, Zhang Q, Liu ZY, Li FL, Lu M, Fang XC: Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104:455–473, 2020.
- Ali U, Anwar Z, Hasan S, Zafar M, Ain NU, Afzal F, ... Eljeam HARA: Bioprocessing and screening of indigenous wastes for hyper production of fungal lipase. *Catalysts* 13(5):853, 2023.
- Anderson EM, Stone ML, Katahira R, Reed M, Beckham GT, Román-Leshkov Y: Flowthrough reductive catalytic fractionation of biomass. *Joule* 1(3):613–622, 2017.
- Annongu AA, Atteh JO, Joseph JK, Belew MA, Adeyina AO, Akanbi AS, ... Edoh JH: Investigation on biochemically processed castor seed meal in nutrition and physiology of japanese quail. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 7(2):501–506, 2017.
- Anuradha Jabasingh S, Varma S, Garre P: Production and purification of cellulase from *Aspergillus nidulans* AJSU04 under solid-state fermentation using coir pith. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 28(1):143–151, 2014.
- AOAC: Official method 2001.11 protein (crude) in animal feed, forage (plant tissue), grain and oilseeds. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 2002.
- AOAC: Official Method 942.05. In *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, 16th ed.; AOAC International: Arlington, VA, USA, 1995.
- Arbige MV, Shetty JK, Chotani GK: Industrial enzymology: the next chapter. *Trends in Biotechnology* 37(12):1355–1366, 2019.
- Arora S, Rani R, Ghosh S: Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. *Journal of Biotechnology* 269:16–34, 2018.
- Avitabile V, Baldoni E, Baruth B, Bausano G, Boysen-Urban K, ..., Zulian G: *Biomass production, supply, uses and flows in the European Union*. Integrated assessment. Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2023.
- Badgujar KC, Bhanage BM: Enhanced biocatalytic activity of lipase immobilized on biodegradable copolymer of chitosan and polyvinyl alcohol support for synthesis of propionate ester: kinetic approach. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 53(49):18806–18815, 2014.
- Badgujar KC, Bhanage BM: The combine use of ultrasound and lipase immobilized on co-polymer matrix for efficient biocatalytic application studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 122:255–264, 2015.
- Badgujar KC, Pai PA, Bhanage BM: Enhanced biocatalytic activity of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase under sonicated condition. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 39(2):211–221, 2016.
- Bakker RR, Elbersen HW: Managing ash content and quality in herbaceous biomass: an analysis from plant to product. In *14<sup>th</sup> European Biomass Conference* 17:21, 2005.
- Ballardo C, Barrena R, Artola A, Sánchez A: A novel strategy for producing compost with enhanced biopesticide properties through solid-state fermentation of biowaste and inoculation with *Bacillus thuringiensis*. *Waste Management* 70:53–58, 2017.
- Baral P, Kumar V, Agrawal D: Emerging trends in high-solids enzymatic saccharification of lignocellulosic feedstocks for developing an efficient and industrially deployable sugar platform. *Critical Reviews in Biotechnology* 42(6):873–891, 2022.

- Barreira JC, Oliveira MBP, Ferreira IC: Development of a novel methodology for the analysis of ergosterol in mushrooms. *Food Analytical Methods* 7:217–223, 2014.
- Bavaro T, Benucci I, Pedrali A, Marrubini G, Esti M, Terreni M, ... Ubiali D: Lipase-mediated hydrolysis of hempseed oil in a packed-bed reactor and in-line purification of PUFA as mono- and diacylglycerols. *Food and Bioproducts Processing* 123:345–353, 2020.
- Bechara MA, Heinemann PH, Walker PN, Romaine CP: A two-phase solid-state fermentation process for mushroom (*Agaricus bisporus*) production on cereal grains. *Biological Engineering* 4(4):219–229, 2011.
- Behling R, Valange S, Chatel G: Heterogeneous catalytic oxidation for lignin valorization into valuable chemicals: what results? What limitations? What trends?. *Green Chemistry* 18(7):1839–1854, 2016.
- Berikten D, Kivanc M: Optimization of solid-state fermentation for phytase production by *Thermomyces lanuginosus* using response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 44(8):834–848, 2014.
- Bezerra MA, Ferreira SLC, Novaes CG, Dos Santos AMP, Valasques GS, da Mata Cerqueira UMF, dos Santos Alves JP: Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry—A review. *Talanta* 194:941–959, 2019.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76(5):965–977, 2008.
- Bhattacharya, S: Ergosterol synthesis. *Encyclopedia of Mycology* 230-238, urednik Óscar Zaragoza, izdavač Oliver Walter, 2021.
- Bibi F, Ilyas N, Arshad M, Khalid A, Saeed M, Ansar S, Batley J: Formulation and efficacy testing of bio-organic fertilizer produced through solid-state fermentation of agro-waste by *Burkholderia cenocepacia*. *Chemosphere* 291:132762, 2022.
- Biermann U, Bornscheuer UT, Feussner I, Meier MA, Metzger JO: Fatty acids and their derivatives as renewable platform molecules for the chemical industry. *Angewandte Chemie International Edition* 60(37):20144–20165, 2021.
- Bórawski P, Bełdycka-Bórawska A, Szymańska EJ, Jankowski KJ, Dubis B, Dunn JW: Development of renewable energy sources market and biofuels in The European Union. *Journal of Cleaner Production* 228:467–484, 2019.
- Bouaziz A, Horchani H, Salem NB, Chaari A, Chaabouni M, Gargouri Y, Sayari A: Enzymatic propyl gallate synthesis in solvent-free system: optimization by response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 67(3–4):242–250, 2010.
- Breig SJM, Luti KJK: Response surface methodology: A review on its applications and challenges in microbial cultures. *Materials Today: Proceedings* 42:2277–2284, 2021.
- Brzozowski AM, Savage H, Verma CS, Turkenburg JP, Lawson DM, Svendsen A, Patkar S: Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. *Biochemistry* 39(49):15071–15082, 2000.
- Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Jakobek L, Šeruga M: Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International Journal of Food Science & Technology* 44(12):2394–2401, 2009.
- Bucić-Kojić A, Šelo G, Zelić B, Planinić M, Tišma M: Recovery of phenolic acid and enzyme production from corn silage biologically treated by *Trametes versicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181:948–960, 2017.

- Budžaki S, Miljić G, Sundaram S, Tišma M, Hessel V: Cost analysis of enzymatic biodiesel production in small-scaled packed-bed reactors. *Applied Energy* 210:268–278, 2018b.
- Budžaki S, Strelec I, Krnić M, Alilović K, Tišma M, Zelić B: Proximate analysis of cold-press oil cakes after biological treatment with *Trametes versicolor* and *Humicola grisea*. *Engineering in Life Sciences* 18(12):924–931, 2018a.
- Burdock GA: Fenaroli's handbook of flavor ingredients. CRC press. 2016
- Burlein GA, Rocha MC: Mechanical and morphological properties of LDPE/PHB blends filled with castor oil pressed cake. *Materials Research* 17:97–105, 2014.
- Cahyanti MN, Doddapaneni TRKC, Kikas T: Biomass torrefaction: An overview on process parameters, economic and environmental aspects and recent advancements. *Bioresource Technology* 301:122737, 2020.
- Canedo MS, de Paula FG, Da Silva FA, Vendruscolo F: Protein enrichment of brewery spent grain from *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 39:1105–1113, 2016.
- Cao Y, Zhuang Y, Yao C, Wu B He B: Purification and characterization of an organic solvent-stable lipase from *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 and its application for efficient resolution of (R, S)-1-phenylethanol. *Biochemical Engineering Journal* 64:55–60, 2012.
- Casas-Godoy L, Arrizon J, Arrieta-Baez D, Plou FJ, Sandoval G: Synthesis and emulsifying properties of carbohydrate fatty acid esters produced from *Agave tequilana* fructans by enzymatic acylation. *Food Chemistry* 204:437–443, 2016.
- Casas-Godoy L, Duquesne S, Bordes F, Sandoval G, Marty A: Lipases: an overview. *Lipases and Phospholipases* 3–30, 2012.
- Castilho LR, Polato CM, Baruque EA, Sant'Anna Jr GL, Freire DM: Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal* 4(3):239–247, 2000.
- Cauglia F, Canepa P: The enzymatic synthesis of glucosylmyristate as a reaction model for general considerations on 'sugar esters' production. *Bioresource Technology* 99(10):4065–4072, 2008.
- Chai Y, Gao N, Wang M, Wu C: H<sub>2</sub> production from co-pyrolysis/gasification of waste plastics and biomass under novel catalyst Ni-CaO-C. *Chemical Engineering Journal* 382:122947, 2020.
- Chen C, Tian H, Xing S, Li C, Zeng X, He L: Influence of different parameters on reverse micelle extraction combined with acetone precipitation to purify sn-1, 3 extracellular lipase from *Aspergillus niger* GZUF36. *Journal of Food Science and Technology* 56(6):2899–2908, 2019.
- Chen H, Shao M, Li H: Effects of gas periodic stimulation on key enzyme activity in gas double-dynamic solid state fermentation (GDD-SSF). *Enzyme and Microbial Technology* 56:35–39, 2014.
- Chen H: *Modern solid state fermentation*. Springer, Netherlands, 2013.
- Chen HZ, He Q: Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 87(12):1619–1625, 2012.
- Cherubini F, Jungmeier G, Wellisch M, Willke T, Skiadas I, Van Ree R, de Jong E: Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 3(5):534–546, 2009.

- Cherubini F: The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management* 51(7):1412–1421, 2010.
- Chysirichote T: Valorization of banana peel for citric acid production under solid state fermentation with *Aspergillus niger*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 34(1):49–57, 2020.
- Clark JH, Deswarte FEI: The biorefinery concept—an integrated approach. U *Introduction to chemicals from biomass*. Wiley, Chichester, 1–20, 2008.
- Cole JA, Brown CM: Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiology Letters*: 7(2):65–72, 1980.
- Colla E, Santos LO, Deamici K, Magagnin G, Vendruscolo M, Costa JAV: Simultaneous production of amyloglucosidase and exo-polygalacturonase by *Aspergillus niger* in a rotating drum reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181:627–637, 2017.
- da Silva MPD, Dutra RS, Casciatori FP, Grajales LM: A two-phase model for simulation of water transfer during lipase production by solid-state cultivation in a tray bioreactor using babassu residues as substrate. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification* 177:108981, 2022.
- Dalsenter FDH, Viccini G, Barga MC, Mitchell DA, Krieger N: A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. *Process Biochemistry* 40(2):801–807, 2005.
- Damaso MCT, Passianoto MA, Freitas SCD, Freire DMG, Lago RCA, Couri S: Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:676–681, 2008.
- Darvishi F, Destain J, Nahvi I, Thonart P, Zarkesh-Esfahani H: Effect of additives on freeze-drying and storage of *Yarrowia lipolytica* lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168:1101–1107, 2012.
- David AJ, Abinandan S, Vaidyanathan VK, Xu CC, Krishnamurthi T: A critical review on current status and environmental sustainability of pre-treatment methods for bioethanol production from lignocellulose feedstocks. *3 Biotech* 13(7):233, 2023.
- de Jong E, Higson A, Walsh P, Wellisch M: Bio-based chemicals value added products from biorefineries. *IEA Bioenergy, Task42 Biorefinery* 34:1–33, 2012.
- de Moura FA, Macagnan FT, da Silva LP: Oligosaccharide production by hydrolysis of polysaccharides: A review. *International Journal of Food Science & Technology* 50(2):275–281, 2015.
- De Rose SA, Novak H, Dowd A, Singh S, Lang DA, Littlechild J: Stabilization of a lipolytic enzyme for commercial application. *Catalysts* 7(3):91, 2017.
- Demirbaş A: Global renewable energy resources. *Energy Sources* 28(8):779–792, 2006.
- Denčić I, de Vaan S, Noël T, Meuldijk J, de Croon M, Hessel V: Lipase-based biocatalytic flow process in a packed-bed microreactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 52(32):10951–10960, 2013.
- Dersjant-Li Y, Awati A, Schulze H, Partridge G: Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(5):878–896, 2015.



- Dhake KP, Tambade PJ, Qureshi ZS, Singhal RS, Bhanage BM: HPMC-PVA film immobilized *Rhizopus oryzae* lipase as a biocatalyst for transesterification reaction. *ACS Catalysis*, 1(4):316–322, 2011.
- Dhillon GS, Brar SK, Kaur S, Verma M: Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. *Industrial Crops and Products* 41:78–84, 2013.
- Di Luccio M, Capra FF, Ribeiro NP, Vargas GDLP, Freire DMG, De Oliveira D: Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113:173–180, 2004.
- Dobrev G, Strinska H, Hambarliiska A, Zhekova B, Dobрева V: Optimization of lipase production in solid-state fermentation by in nutrient medium containing agroindustrial wastes. *The Open Biotechnology Journal* 12(1):189–203, 2018.
- Dotto JM, Chacha JS: The potential of pumpkin seeds as a functional food ingredient: A review. *Scientific African* 10:e00575, 2020.
- Doukyu N, Ogino H: Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal* 48(3):270–282, 2010.
- Droźłowska E, Łopusiewicz Ł, Meżyńska M, Bartkowiak A: Valorization of flaxseed oil cake residual from cold-press oil production as a material for preparation of spray-dried functional powders for food applications as emulsion stabilizers. *Biomolecules* 10(1):153, 2020.
- Du B, Song Y, Hu X, Liao X, Ni Y, Li Q: Oligosaccharides prepared by acid hydrolysis of polysaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata*) pulp and their prebiotic activities. *International Journal of Food Science & Technology* 46(5):982–987, 2011.
- Du LH, Luo XP: Lipase-catalyzed regioselective acylation of sugar in microreactors. *RSC Advances* 2(7):2663–2665, 2012.
- Dudu AI, Lăcătuș MA, Bencze LC, Paizs C, Toșa MI: Green process for the enzymatic synthesis of aroma compounds mediated by lipases entrapped in tailored sol–gel matrices. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 9(15):5461–5469, 2021.
- Duong-Ly KC, Gabelli SB: Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *U Methods in Enzymology*. Academic Press, 541:85–94, 2014.
- Ebrahimpour A, Rahman R, Ean Ch'ng D, Basri M, Salleh A: A modeling study by response surface methodology and artificial neural network on culture parameters optimization for thermostable lipase production from a newly isolated thermophilic *Geobacillus* sp. strain ARM. *BMC Biotechnology* 8(1):96, 2008.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Safety and efficacy of iron compounds (E1) as feed additives for all animal species: ferrous carbonate; ferric chloride, hexahydrate; ferrous fumarate; ferrous sulphate, heptahydrate; ferrous sulphate, monohydrate; ferrous chelate of amino acids, hydrate; ferrous chelate of glycine, hydrate, based on a dossier submitted by FEFANA asbl. *EFSA Journal* 14(2):4396, 2016.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk D, Bignami M, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, ... Hogstrand C: Risk assessment of nitrate and nitrite in feed. *EFSA Journal* 18(11):e06290, 2020.

- Elinge CM, Muhammad A, Atiku FA, Itodo AU, Peni IJ, Sanni OM, Mbongo AN: Proximate, mineral and anti-nutrient composition of pumpkin (*Cucurbita pepo* L) seeds extract. *International Journal of Plant Research* 2(5):146–150, 2012.
- Elisashvili V, Penninckx M, Kachlishvili E, Asatiani M, Kvesitadze G: Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology* 38(7):998–1004, 2006.
- Erythropel HC, Zimmerman JB, de Winter TM, Petitjean L, Melnikov F, Lam CH, ... Anastas PT: The Green ChemistREE: 20 years after taking root with the 12 principles. *Green Chemistry* 20(9):1929–1961, 2018.
- Escamilla-Alvarado C, Pérez-Pimienta JA, Ponce-Noyola T, Poggi-Varaldo HM: An overview of the enzyme potential in bioenergy-producing biorefineries. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 92(5):906–924, 2016.
- Escobar N, Laibach N: Sustainability check for bio-based technologies: A review of process-based and life cycle approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 135:110213, 2021.
- European Commission, Joint Research Centre, Camia A, Giuntoli J, Jonsson R, i sur: *The use of woody biomass for energy production in the EU*. Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2021.
- Ezenwelu CO, Afeez OA, Anthony OU, Promise OA, Mmesoma UEC, Henry OE: Studies on properties of lipase produced from *Aspergillus* sp. isolated from compost soil. *Advances in Enzyme Research* 10(2):49–60, 2022.
- Fath M, Fazaelpoor MH: Production of proteases in a novel trickling tray bioreactor. *Waste and Biomass Valorization* 6:475–480, 2015.
- Fathy SA, Mahmoud AE, Rashad MM, Ezz MK, Mohammed AT: Improving the nutritive value of olive pomace by solid state fermentation of *Kluyveromyces marxianus* with simultaneous production of gallic acid. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 7:135–141, 2018.
- Fatima S, Faryad A, Ataa A, Joyia FA, Parvaiz A: Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 68(3):445–458, 2021.
- Fernandes MLM, Saad EB, Meira JA, Ramos LP, Mitchell DA, Krieger N: Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 44(1):8–13, 2007.
- Fernandez-Aulis F, Torres A, Sanchez-Mendoza E, Cruz L, Navarro-Ocana A: New acylated cyanidin glycosides extracted from underutilized potential sources: Enzymatic synthesis, antioxidant activity and thermostability. *Food Chemistry* 309:125796, 2020.
- Ferreira JA, Brancoli P, Agnihotri S, Bolton K, Taherzadeh MJ: A review of integration strategies of lignocelluloses and other wastes in 1st generation bioethanol processes. *Process Biochemistry* 75:173–186, 2018.
- Ferreira LM, de Melo RR, Pimenta AS, de Azevedo TKB, de Souza CB: Adsorption performance of activated charcoal from castor seed cake prepared by chemical activation with phosphoric acid. *Biomass Conversion and Biorefinery* 12(4):1181–1192, 2022.

- Ferreira-Dias S, Sandoval G, Plou F, Valero F: The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electronic Journal of Biotechnology* 16(3):12–12, 2013.
- Figueroa-Montero A, Esparza-Isunza T, Saucedo-Castañeda G, Huerta-Ochoa S, Gutiérrez-Rojas M, Favela-Torres E: Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 86(10):1321–1331, 2011.
- Figueroa-Montero A, Esparza-Isunza T, Saucedo-Castañeda G, Huerta-Ochoa S, Gutiérrez-Rojas M, Favela-Torres E: Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 86(10):1321–1331, 2011.
- Finkler ATJ, Weber MZ, Fuchs GA, Scholz LA, de Lima Luz Jr LF, Krieger N, ... de Matos Jorge LM: Estimation of heat and mass transfer coefficients in a pilot packed-bed solid-state fermentation bioreactor. *Chemical Engineering Journal* 408:127246, 2021.
- Fischer M, Pleiss J: The lipase engineering database: a navigation and analysis tool for protein families. *Nucleic Acids Research* 31(1):319–321, 2003.
- Fraile JM, García JI, Herrerias CI, Pires E: Synthetic transformations for the valorization of fatty acid derivatives. *Synthesis* 49(07):1444–1460, 2017.
- Gaffey J, Rajuaria G, McMahon H, Ravindran R, Dominguez C, Jensen MA, ... Sanders JP: Green Biorefinery systems for the production of climate-smart sustainable products from grasses, legumes and green crop residues. *Biotechnology Advances* 108168, 2023.
- Gaffney M, Doyle S, Murphy R: Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in solid state fermentation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73(12):2640–2644, 2009.
- Gang W, Guang C, Ming W: Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Bacillus cereus* BF-3. *African Journal of Biotechnology* 10(61):13174–13179, 2011.
- Gao K, Chu W, Sun J, Mao X: Identification of an alkaline lipase capable of better enrichment of EPA than DHA due to fatty acids selectivity and regioselectivity. *Food Chemistry* 330:127225, 2020.
- Gaonkar V, Rosentrater KA: Soybean. U *Integrated processing technologies for food and agricultural by-products*. Academic Press, 73–104, 2019.
- Geneau-Sbartai C, Leyris J, Silvestre F, Rigal L: Sunflower cake as a natural composite: composition and plastic properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(23):11198–11208, 2008.
- Ghaleb AAS, Kutty SRM, Salih GHA, Jagaba AH, Noor A, Kumar V, ... Saleh Al-dhawi BN: Sugarcane bagasse as a co-substrate with oil-refinery biological sludge for biogas production using batch mesophilic anaerobic co-digestion technology: Effect of carbon/nitrogen ratio. *Water* 13(5):590, 2021.
- Giakoumis EG: Analysis of 22 vegetable oils' physico-chemical properties and fatty acid composition on a statistical basis, and correlation with the degree of unsaturation. *Renewable Energy* 126:403–419, 2018.
- Girelli AM, Chiappini V: Renewable, sustainable, and natural lignocellulosic carriers for lipase immobilization: A review. *Journal of Biotechnology* 365:29–47, 2023.

- Goering HK, Van Soest PJ Forage Fiber Analysis: Apparatus, Reagents, Pcedures and some Applications. U *USDA-ARS Agricultural Handbook 379*, Washington DC, USA, 1–24, 1970.
- Gollakota ARK, Kishore N, Gu S: A review on hydrothermal liquefaction of biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 81:1378–1392, 2018.
- Gomes J, Purkarthofer H, Hayn M, Kapplmüller J, Sinner M, Steiner W: Production of a high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39(6):700–707, 1993.
- Gómez-Cruz I, Cara C, Romero I, Castro E, Gullón B: Valorisation of exhausted olive pomace by an eco-friendly solvent extraction process of natural antioxidants. *Antioxidants* 9(10):1010, 2020.
- Gonçalves KM, Barbosa LRS, Lima LMTR, Cortines JR, Kalume DE, Leal ICR, i sur.: Conformational dissection of *Thermomyces lanuginosus* lipase in solution. *Biophysical Chemistry* 185:88–97, 2014.
- Gonçalves MCP, Amaral JC, Fernandez-Lafuente R, Sousa Junior RD, Tardioli PW: Lipozyme 435-mediated synthesis of xylose oleate in methyl ethyl ketone. *Molecules* 26(11):3317, 2021.
- Gong Y, Liu J, Jiang M, Liang Z, Jin H, Hu X, ... Hu C: Improvement of omega-3 docosahexaenoic acid production by marine dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* using rapeseed meal hydrolysate and waste molasses as feedstock. *PLoS One* 10(5):e0125368, 2015.
- Gramany V, Khan FI, Govender A, Bisetty K, Singh S, Permaul K: Cloning, expression, and molecular dynamics simulations of a xylosidase obtained from *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 34(8):1681–1692, 2015.
- Grasso S, Omoarukhe E, Wen X, Papoutsis K, Methven L: The use of upcycled defatted sunflower seed flour as a functional ingredient in biscuits. *Foods* 8(8):305, 2019.
- Grgić J, Šelo G, Planinić M, Tišma M, Bucić-Kojić A: Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants* 9(10):923, 2020.
- Gunasekaran M, Kumar G, Karthikeyan OP, Varjani S: Lignocellulosic biomass as an optimistic feedstock for the production of biofuels as valuable energy source: Techno-economic analysis, environmental impact analysis, breakthrough and perspectives. *Environmental Technology & Innovation* 24:102080, 2021.
- Gunathilake T, Akanbi TO, Barrow CJ: Lipase-produced omega-3 acylglycerols for the fortification and stabilization of extra virgin olive oil using hydroxytyrosyl palmitate. *Future Foods* 4:100045, 2021.
- Guo Y, Yeh T, Song W, Xu D, Wang S: A review of bio-oil production from hydrothermal liquefaction of algae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 48:776–790, 2015.
- Gutiérrez-Ayesta C, Carelli AA, Ferreira ML: Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(1–2):35–43, 2007.
- Gutiérrez-Escobar R, Aliaño-González MJ, Cantos-Villar E: Wine polyphenol content and its influence on wine quality and properties: A review. *Molecules* 26(3):718, 2021.

- Haldar D, Purkait MK: Micro and nanocrystalline cellulose derivatives of lignocellulosic biomass: A review on synthesis, applications and advancements. *Carbohydrate Polymers* 250:116937, 2020.
- Han Q, Wang X, Byrne N: Understanding the influence of key ionic liquid properties on the hydrolytic activity of *Thermomyces lanuginosus* lipase. *ChemCatChem* 8(8):1551–1556, 2016.
- Harris GK, Marshall MR: Ash analysis. *Food Analysis* 287–297, 2017.
- Hasunuma T, Okazaki F, Okai N, Hara KY, Ishii J, Kondo A: A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology* 135:513–522, 2013.
- He Q, Chen H: Pilot-scale gas double-dynamic solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Food and Bioprocess Technology* 6:2916–2924, 2013.
- Hideno A, Inoue H, Tsukahara K, Fujimoto S, Minowa T, Inoue S, ... Sawayama S: Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresource Technology* 100(10):2706–2711, 2009.
- Hölker U, Höfer M, Lenz J: Biotechnology advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(2):175–186, 2004.
- Hsu CH, Tsai SW: Improvements of *Acinetobacter radioresistens* lipase adsorption on celite 535 by adding salts. *Journal of Applied Science and Engineering* 4(2):133–139, 2001.
- Hsu PK, Liu CP, Liu LY, Chang CH, Yang SS: Protein enrichment and digestion improvement of napiergrass and pangolagrass with solid-state fermentation. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 46(3):171–179, 2013.
- Hu CC, Liu LY, Yang SS: Protein enrichment, cellulase production and in vitro digestion improvement of pangolagrass with solid state fermentation. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 45(1):7–14, 2012.
- Hue C, Gunata Z, Bergounhou A, Assemat S, Boulanger R, Sauvage FX, Davrieux F: Near infrared spectroscopy as a new tool to determine cocoa fermentation levels through ammonia nitrogen quantification. *Food Chemistry* 148:240–245, 2014.
- Irmak S, Meryemoglu B, Sandip A, Subbiah J, Mitchell RB, Sarath G: Microwave pretreatment effects on switchgrass and miscanthus solubilization in subcritical water and hydrolysate utilization for hydrogen production. *Biomass and Bioenergy* 108:48–54, 2018.
- Jaiswal KS, Rathod VK: Acoustic cavitation promoted lipase catalysed synthesis of isobutyl propionate in solvent free system: Optimization and kinetic studies. *Ultrasonics Sonochemistry* 40:727–735, 2018.
- Jamilu H, Ibrahim AH, Abdullahi SZ: Isolation, optimization and characterization of lipase producing bacteria from abattoir soil. *International Journal of Scientific Advances* 3:75–82, 2022.
- Jasińska K, Zieniuk B, Nowak D, Fabiszewska A: Studies on the catalytic properties of crude freeze-dried preparations of *Yarrowia lipolytica* extracellular lipases for geranyl ester derivative synthesis. *Biomolecules* 11(6):839, 2021.
- Jathanna HM, Rao CV, Goveas LC: Exploring Pongamia seed cake hydrolysate as a medium for microbial lipid production by *Aspergillus ochraceus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 24:101543, 2020.

- Jensen B, Nebelong P, Olsen J, Reeslev M: Enzyme production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnology Letters* 24(1):41–45, 2002.
- Jokioja J, Yang B, Linderborg KM: Acylated anthocyanins: A review on their bioavailability and effects on postprandial carbohydrate metabolism and inflammation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20(6):5570–5615, 2021.
- Jones DB: Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins (No. 183). *US Department of Agriculture*, 1931.
- Juodeikiene G, Cizeikiene D, Ceskeviciute V, Vidmantiene D, Basinskiene L, Akuneca I, ... Petrauskas A: Solid-state fermentation of *Silybum marianum* L. seeds used as additive to increase the nutritional value of wheat bread. *Food Technology and Biotechnology* 51(4):528–538, 2013.
- Kachel-Jakubowska M, Kraszkiewicz A, Krajewska M: Possibilities of using waste after pressing oil from oilseeds for energy purposes. *Agricultural Engineering* 20(1):45–54, 2016.
- Kamal MZ, Yedavalli P, Deshmukh MV, Rao NM: Lipase in aqueous-polar organic solvents: Activity, structure, and stability. *Protein Science* 22(7):904–915, 2013.
- Kamm B, Gruber PR, Kamm M: *Biorefineries-industrial processes and products (Vol. 2)*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. K GaA, Weinheim, 2006.
- Kamm B, Kamm MJAM: Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64:137–145, 2004.
- Kang S, Fu J, Zhang G: From lignocellulosic biomass to levulinic acid: A review on acid-catalyzed hydrolysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 94:340–362, 2018.
- Kapoor M, Gupta MN: Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry* 47(4):555–569, 2012.
- Kempka AP, Lipke NL, Pinheiro TLF, Menoncin S, Treichel H, Freire DMG, Di Luccio M, de Oliveira D: Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31:119–125, 2008.
- Khan FI, Bisetty K, Singh S, Permaul K, Hassan MI: Chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP and its biotechnological applications. *Extremophiles* 19:1055–1066, 2015.
- Khan FI, Lan D, Durrani R, Huan W, Zhao Z, Wang Y: The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 5:16, 2017.
- Khattab RY, Zeitoun MA: Quality evaluation of flaxseed oil obtained by different extraction techniques. *LWT-Food Science and Technology* 53(1):338–345, 2013.
- Kim K, Choi B, Lee I, Lee H, Kwon S, Oh K, Kim AY: Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(9):1561–1568, 2011.
- Kotecka-Majchrzak K, Sumara A, Fornal E, Montowska M: Oilseed proteins—properties and application as a food ingredient. *Trends in Food Science & Technology* 106:160–170, 2020.
- Koyani RD, Rajput KS: Solid state fermentation: comprehensive tool for utilization of lignocellulosic through biotechnology. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* 5(258):1–15, 2015.

- Kreilgaard L, Frokjaer S, Flink JM, Randolph TW, Carpenter JF: Effects of additives on the stability of *Humicola lanuginosa* lipase during freeze-drying and storage in the dried solid. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88(3):281–290, 1999.
- Kumar A, Dhar K, Kanwar S, Arora PK: Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biological Procedures Online* 18:1–11, 2016.
- Kumar A, Kanwar SS: Lipase production in solid-state fermentation (SSF): Recent developments and biotechnological applications. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology* 6(1):13–27, 2012.
- Kumar DS, Ray S: Fungal lipase production by solid state fermentation—an overview. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques* 6(230):1–10, 2014.
- Kumar S, Tsai C-J, Nussinov R: Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering, Design and Selection* 13(3):179–191, 2000.
- Kushawaha DK, Yadav M, Chatterji S, Srivastava AK, Watal G:  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity assessment of *Cucurbita maxima* seeds—a LIBS based study. *International Journal of Phytomedicine* 8:312–318, 2016.
- Leite P, Salgado JM, Venâncio A, Domínguez JM, Belo I: Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 214:737–746, 2016.
- Leite P, Silva C, Salgado JM, Belo I: Simultaneous production of lignocellulolytic enzymes and extraction of antioxidant compounds by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Industrial Crops and Products* 137:315–322, 2019.
- Li F, Wei Y, Liang L, Huang L, Yu G, Li Q: A novel low-molecular-mass pumpkin polysaccharide: Structural characterization, antioxidant activity, and hypoglycemic potential. *Carbohydrate Polymers* 251:117090, 2021.
- Li X, Zhang D, Yang TY, Bryden WL: Phosphorus bioavailability: a key aspect for conserving this critical animal feed resource with reference to broiler nutrition. *Agriculture* 6(2):25, 2016.
- Lin YS, Lee WC, Duan KJ, Lin YH: Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation in rotary drum reactor using thermotolerant *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Energy* 105:389–394, 2013.
- Linares-Pasten J, Andersson M, Karlsson E: Thermostable glycoside hydrolases in biorefinery technologies. *Current Biotechnology* 3(1):26–44, 2014.
- Lisboa P, Rodrigues AR, Martín JL, Simões P, Barreiros S, Paiva A: Economic analysis of a plant for biodiesel production from waste cooking oil via enzymatic transesterification using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* 85:31–40, 2014.
- Liu J, Li DB, Yang JC: Operating characteristics of solid-state fermentation bioreactor with air pressure pulsation. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43:211–216, 2007.
- Liu Y, Zhang Y, Xu J, Sun Y, Yuan Z, Xie J: Consolidated bioprocess for bioethanol production with alkali-pretreated sugarcane bagasse. *Applied Energy* 157:517–522, 2015.
- Loow YL, New EK, Yang GH, Ang LY, Foo LYW, Wu TY: Potential use of deep eutectic solvents to facilitate lignocellulosic biomass utilization and conversion. *Cellulose* 24:3591–3618, 2017.

- Madrera RR, Bedriñana RP, Valles BS: Production and characterization of aroma compounds from apple pomace by solid-state fermentation with selected yeasts. *LWT-Food Science and Technology* 64(2):1342–1353, 2015.
- Mahmoud HA, Rashad MM, Mahmoud AE, Hamdy GM, Fathy SA: Production and optimization of xylooligosaccharides from beech wood xylan by *Bacillus amyloliquifaciens* NRRL B-14393 xylanase and its antioxidant potential. *Egyptian Pharmaceutical Journal* 21(1):97, 2022.
- Maity SK: Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part II. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 43:1446–1466, 2015.
- Makolomakwa M, Puri AK, Permaul K, Singh S: Thermo-acid-stable phytase-mediated enhancement of bioethanol production using *Colocasia esculenta*. *Bioresource Technology* 235:396–404, 2017.
- Manfred K: Bioeconomy – Present status and future needs of industrial value chains. *New Biotechnology* 60:96–104, 2020.
- Manimaran A, Kumar KS, Permaul K, Singh S: Hyper production of cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp and its application in biobleaching. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81:887–893, 2009.
- Mannucci A, Castagna A, Santin M, Serra A, Mele M, Ranieri A: Quality of flaxseed oil cake under different storage conditions. *LWT* 104:84–90, 2019.
- Mansoldo FRP, Firpo R, da Silva Cardoso V, Queiroz GN, Cedrola SML, de Godoy MG, Vermelho AB: New method for rapid identification and quantification of fungal biomass using ergosterol autofluorescence. *Talanta* 219:121238, 2020.
- Marangoni AG: Enzyme kinetics of lipolysis revisited: the role of lipase interfacial binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200(3):1321–1328, 1994.
- Marathe SJ, Shah NN, Bajaj SR, Singhal RS: Esterification of anthocyanins isolated from floral waste: Characterization of the esters and their application in various food systems. *Food Bioscience* 40:100852, 2021.
- Martinović J, Lukinac J, Jukić M, Ambrus R, Planinić M, Šelo G, ... Bucić-Kojić A: Physicochemical characterization and evaluation of gastrointestinal in vitro behavior of alginate-based microbeads with encapsulated grape pomace extracts. *Pharmaceutics* 15(3):980, 2023.
- Matsuzawa M, Muramatsu T, Yamamori T, Knoll W, Yano R: Characterization and biobleaching effect of hemicellulases produced by thermophilic fungi. *Biotechnology Letters* 21:415–420, 1999.
- McGinty D, Letizia CS, Api AM: Fragrance material review on benzyl butyrate. *Food and Chemical Toxicology* 50:S407–S411, 2012.
- Mchunu NP, Permaul K, Alam M, Singh S: Carbon utilization profile of a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus* using phenotypic microarray. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4(9A):24–32, 2013.
- Medina A, Vassileva M, Caravaca F, Roldán A, Azcón R: Improvement of soil characteristics and growth of *Dorycnium pentaphyllum* by amendment with agrowastes and inoculation with AM fungi and/or the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Chemosphere* 56(5):449–456, 2004.
- Mei J, Zhao X, Yi Y, Zhang Y, Wang X, Ying G: Preparation of astaxanthin by lipase-catalyzed hydrolysis from its esters in a slug-flow microchannel reactor. *Process Biochemistry* 98:241–246, 2020.



- Melo D, Álvarez-Ortí M, Nunes MA, Costa AS, Machado S, Alves RC, ... Oliveira MBP: Whole or defatted sesame seeds (*Sesamum indicum* L.)? The effect of cold pressing on oil and cake quality. *Foods* 10(9):2108, 2021.
- Meneses NG, Martins S, Teixeira JA, Mussatto SI: Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology* 108:152–158, 2013.
- Merrill AL, Watt BK: *Energy value of foods: basis and derivation (No. 74)*. Human Nutrition Research Branch, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, 1955.
- Mesa M, Pereañez JA, Preciado LM, Bernal C: How the Triton X-100 modulates the activity/stability of the *Thermomyces lanuginose* lipase: Insights from experimental and molecular docking approaches. *International Journal of Biological Macromolecules* 120:2410–2417, 2018.
- Mika LT, Cséfalvay E, Németh Á: Catalytic conversion of carbohydrates to initial platform chemicals: chemistry and sustainability. *Chemical Reviews* 118(2):505–613, 2018.
- Mikulcová V, Kašpárková V, Humpolíček P, Buňková L: Formulation, characterization and properties of hemp seed oil and its emulsions. *Molecules* 22(5):700, 2017.
- Miller GL: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3):426–428, 1959.
- Mirpoor SF, Giosafatto CVL, Porta R: Biorefining of seed oil cakes as industrial co-streams for production of innovative bioplastics. A review. *Trends in Food Science & Technology* 109:259–270, 2021.
- Mitchell DA, Cunha LEN, Machado AVL, de Lima Luz Jr LF, Krieger N: A model-based investigation of the potential advantages of multi-layer packed beds in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 48(2):195–203, 2010.
- Mitchell DA, Ruiz HA, Krieger N: A critical evaluation of recent studies on packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. *Processes* 11(3):872, 2023.
- Mitchell DA, von Meien OF, Krieger N: Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 13(2-3):137–147, 2003.
- Mohammadi M, Zamani A, Karimi K: Determination of glucosamine in fungal cell walls by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(42):10511–10515, 2012.
- Molina-Penate E, Sánchez A, Artola A: Enzymatic hydrolysis of the organic fraction of municipal solid waste: Optimization and valorization of the solid fraction for *Bacillus thuringiensis* biopesticide production through solid-state fermentation. *Waste Management* 137:304–311, 2022.
- Mondala A, Al-Mubarak R, Atkinson J, Shields S, Young B, Senger YDS, Pekarovic J: Direct solid-state fermentation of soybean processing residues for the production of fungal chitosan by *Mucor rouxii*. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering* 3(02):11, 2015.
- Money NP: Fungi and biotechnology. U *The fungi*. Academic Press, 401–424, 2016.
- Moon YU, Curtis RA, Anderson CO, Blanch HW, Prausnitz JM: Protein–protein interactions in aqueous ammonium sulfate solutions. Lysozyme and bovine serum albumin (BSA). *Journal of Solution Chemistry* 29:699–718, 2000.

- Morales-Medina R, Munio M, Guadix A, Guadix EM, Camacho F: A lumped model of the lipase catalyzed hydrolysis of sardine oil to maximize polyunsaturated fatty acids content in acylglycerols. *Food Chemistry* 240:286–294, 2018.
- Morejón Caraballo S, Rohm H, Struck S: Green solvents for deoiling pumpkin and sunflower press cakes: impact on composition and technofunctional properties. *International Journal of Food Science & Technology* 58(4):1931–1939, 2023.
- Mulakhudair AR, Hanotu J, Zimmerman W: Exploiting ozonolysis-microbe synergy for biomass processing: Application in lignocellulosic biomass pretreatment. *Biomass and Bioenergy* 105:147–154, 2017.
- Murtaza G, Karim S, Akram MR, Khan SA, Azhar S, Mumtaz A, Bin Asad MHH: Caffeic acid phenethyl ester and therapeutic potentials. *BioMed Research International* 145324, 2014.
- Nagel F-JJI, Tramper J, Bakker MS, Rinzema A: Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 72(2):219–230, 2000b.
- Nagel F-JJI, Tramper J, Bakker MSN, Rinzema A: Model for on-line moisture-content control during solid-state fermentation. *Biotechnology & Bioengineering* 72(2):231–243, 2000a.
- Nair A, Sarma SJ: The impact of carbon and nitrogen catabolite repression in microorganisms. *Microbiological Research* 251:126831, 2021.
- Nargotra P, Sharma V, Gupta M, Kour S, Bajaj BK: Application of ionic liquid and alkali pretreatment for enhancing saccharification of sunflower stalk biomass for potential biofuel-ethanol production. *Bioresource Technology* 267:560–568, 2018.
- Neta NDAS, dos Santos JCS, de Oliveira Sancho S, Rodrigues S, Gonçalves LRB, Rodrigues LR, Teixeira JA: Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. *Food Hydrocolloids* 27(2):324–331, 2012.
- Nguyen TAV, Le TD, Phan HN, Tran LB: Hydrolysis activity of virgin coconut oil using lipase from different sources. *Scientifica*, 2018:9120942, 2018.
- Niu L, Zhang H, Wu Z, Wang Y, Liu H, Wu X, Wang W: Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. *PLoS One* 13(12):e0202238, 2018.
- Nizami AS, Rehan M, Waqas M, Naqvi M, Ouda OKM, Shahzad K, Miandad R, Khan MZ, Syamsiro M, Ismail IMI, Pant D: Waste biorefineries: Enabling circular economies in developing countries. *Bioresource Technology* 241:1101–1117, 2017.
- Noro J, Castro TG, Cavaco-Paulo A, Silva C: Substrate hydrophobicity and enzyme modifiers play a major role in the activity of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Catalysis Science & Technology* 10(17):5913–5924, 2020.
- Novák P, Havlíček V: Protein extraction and precipitation. U *Proteomic profiling and analytical chemistry*. Elsevier, 51–62, 2016.
- Nunes MA, Costa AS, Bessada S, Santos J, Puga H, Alves RC, ... Oliveira MBP: Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid-and water-soluble components. *Science of the Total Environment* 644:229–236, 2018.
- Octave S, Thomas D: Biorefinery: toward an industrial metabolism. *Biochimie* 91:659–664, 2009.
- Orejuela-Escobar LM, Landázuri AC, Goodell B: Second generation biorefining in Ecuador: Circular bioeconomy, zero waste technology, environment and sustainable development: The nexus. *Journal of Bioresources and Bioproducts* 6(2):83–107, 2021.

- Ortiz GE, Ponce-Mora MC, Nosedá DG, Cazabat G, Saravalli C, López MC, ... Albertó EO: Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 44(2):197–211, 2017.
- Osman AI, Mehta N, Elgarahy AM, Al-Hinai A, Al-Muhtaseb AAH, Rooney DW: Conversion of biomass to biofuels and life cycle assessment: a review. *Environmental Chemistry Letters* 19:4075–4118, 2021.
- Osman AI: Mass spectrometry study of lignocellulosic biomass combustion and pyrolysis with NO<sub>x</sub> removal. *Renewable Energy* 146:484–496, 2020.
- Palacios D, Busto MD, Ortega N: Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aqueous media. *LWT-Food Science and Technology* 55(2):536–542, 2014.
- Palomo JM, Fuentes M, Fernández-Lorente G, Mateo C, Guisan JM, Fernández-Lafuente R: General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 4(1):1–6, 2003.
- Paludo N, Alves JS, Altmann C, Ayub MA, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC: The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. *Ultrasonics Sonochemistry* 22:89–94, 2015.
- Patel H, Chapla D, Divecha J, Shah A: Improved yield of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase by newly isolated *Aspergillus niger* ADH-11 and synergistic effect of crude enzyme on saccharification of maize stover. *Bioresources and Bioprocessing* 2(1):1–14, 2015.
- Paul S, Dutta A: Challenges and opportunities of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Resources, Conservation and Recycling* 130:164–174, 2018.
- Pereira MG, Vici AC, Facchini FDA, Tristão AP, Cursino-Santos JR, Sanches PR, Jorge JA, De Moraes Polizeli MLT: Screening of filamentous fungi for lipase production: *Hypocrea pseudokoningii* a new producer with a high biotechnological potential. *Biocatalysis and Biotransformation* 32(1):74–83, 2014.
- Peričin D, Krimer V, Trivić S, Radulović L: The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull. *Food Chemistry* 113(2):450–456, 2009.
- Periyasamy S, Karthik V, Senthil Kumar P, Isabel JB, Temesgen T, Hunegnaw BM, ... Vo DVN: Chemical, physical and biological methods to convert lignocellulosic waste into value-added products. A review. *Environmental Chemistry Letters* 20(2):1129–1152, 2022.
- Perkins G, Bhaskar T, Konarova M: Process development status of fast pyrolysis technologies for the manufacture of renewable transport fuels from biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 90:292–315, 2018.
- Persson M, Mladenoska I, Wehtje E, Adlercreutz P: Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 31(6):833–841, 2002.
- Piedrahita-Aguirre CA, Bastos RG, Carvalho AL, Monte Alegre R: The influence of process parameters in production of lipopeptide iturin A using aerated packed bed bioreactors in solid-state fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37:1569–1576, 2014.
- Pilots4U Bioeconomy Innovation Database. <https://biopilots4u.eu/> [15.6.2023.]

- Pitol LO, Biz A, Mallmann E, Krieger N, Mitchell DA: Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal* 283:1009–1018, 2016.
- Poria V, Rana A, Kumari A, Grewal J, Pranaw K, Singh S: Current perspectives on chitinolytic enzymes and their agro-industrial applications. *Biology* 10(12):1319, 2021.
- Poveda-Giraldo JA, Solarte-Toro JC, Alzate CAC: The potential use of lignin as a platform product in biorefineries: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 138:110688, 2021.
- Prabhavathi Devi BLA, Guo Z, Xu X: Characterization of cross-linked lipase aggregates. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86:637–642, 2009.
- Priya K, Chadha A: Synthesis of hydrocinnamic esters by *Pseudomonas cepacia* lipase. *Enzyme and Microbial Technology* 32(3–4):485–490, 2003.
- Qasim U, Rafiq S, Jamil F, Ahmed A, Ali T, Kers J, ... Park YK: Processing of lignocellulose in ionic liquids: A cleaner and sustainable approach. *Journal of Cleaner Production* 323:129189, 2021.
- Quereshi S, Jadhao PR, Pandey A, Ahmad E, Pant KK: Overview of sustainable fuel and energy technologies. U *Sustainable Fuel Technologies Handbook*. Academic Press, 3–25, 2021.
- Raheem A, Azlina WW, Yap YT, Danquah MK, Harun R: Thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 49:990–999, 2015.
- Rahman M, de Jiménez MM: Designer oil crops. U *Breeding oilseed crops for sustainable production*. Academic Press, 361–376, 2016.
- Rahman MA, Møller HB, Saha CK, Alam MM, Wahid R, Feng L: Anaerobic co-digestion of poultry droppings and briquetted wheat straw at mesophilic and thermophilic conditions: Influence of alkali pretreatment. *Renewable Energy* 128:241–249, 2018.
- Rana AK, Gupta VK, Newbold J, Roberts D, Rees RM, Krishnamurthy S, Thakur VK: Sugar beet pulp: Resurgence and trailblazing journey towards a circular bioeconomy. *Fuel* 312:122953, 2022.
- Rani R, Ghosh S: Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. *Bioresource Technology* 102(22):10641–10649, 2011.
- Rezig L, Chouaibi M, Msaada K, Hamdi S: Chemical composition and profile characterisation of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products* 37(1):82–87, 2012.
- Ribeiro TB, Oliveira AL, Costa C, Nunes J, Vicente AA, Pintado M: Total and sustainable valorisation of olive pomace using a fractionation approach. *Applied Sciences* 10(19):6785, 2020.
- Rodrigues ML: The multifunctional fungal ergosterol. *MBio* 9(5):e01755–18, 2018.
- Roschangar F, Sheldon RA, Senanayake CH: Overcoming barriers to green chemistry in the pharmaceutical industry—the Green Aspiration Level™ concept. *Green Chemistry* 17(2):752–768, 2015.
- Ruiz HA, Rodríguez-Jasso RM, Rodríguez R, Contreras-Esquível JC, Aguilar CN: Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 65:90–95, 2012.

- Saber WIA, El-Naggar NE, AbdAl-Aziz SA: Bioconversion of lignocellulosic wastes into organic acids by cellulolytic rock phosphate-solubilizing fungal isolates grown under solid-state fermentation conditions. *Research Journal of Microbiology* 5(1):1–20, 2010.
- Saithi S, Tongta A: Phytase production of *Aspergillus niger* on soybean meal by solid-state fermentation using a rotating drum bioreactor. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 11:25–30, 2016.
- Salgado CA, dos Santos CIA, Vanetti MCD: Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. *Food Bioscience* 101509, 2021.
- Salihi A, Alam MZ: Solvent tolerant lipases: a review. *Process Biochemistry* 50(1):86–96, 2015.
- Sarkar N, Chakraborty D, Dutta R, Agrahari P, Bharathi SD, Singh AA, Jacob S: A comprehensive review on oilseed cakes and their potential as a feedstock for integrated biorefinery. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics* 4(3):376–387, 2021.
- Sassner P, Galbe M, Zacchi G: Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy* 32(5):422–430, 2008.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B: Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409(6817):258–268, 2001.
- Secundo F, Carrea G: Lipase activity and conformation in neat organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19:93–102, 2002.
- Secundo F, Carrea G: Mono- and disaccharides enhance the activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase in organic solvent but do not significantly affect its conformation. *Biotechnology and Bioengineering* 92(4):438–446, 2005.
- Seo WD, Kang JE, Choi SW, Lee KS, Lee MJ, Park KD, Lee JH: Comparison of nutritional components (isoflavone, protein, oil, and fatty acid) and antioxidant properties at the growth stage of different parts of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Food Science and Biotechnology* 26:339–347, 2017.
- Seymen M, Uslu N, Türkmen Ö, Al Juhaimi F, Özcan MM: Chemical compositions and mineral contents of some hull-less pumpkin seed and oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 93:1095–1099, 2016.
- Shafei MS, Allam RF: Production and immobilization of partially purified lipase from *Penicillium chrysogenum*. *Malaysian Journal of Microbiology* 6(2):196–202, 2010.
- Shah KR, Bhatt SA: Purification and characterization of lipase from *Bacillus subtilis* Pa2. *Journal of Biochemical Technology* 3(3):292–295, 2012.
- Sharma HK, Xu C, Qin W: Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: an overview. *Waste and Biomass Valorization* 10:235–251, 2019.
- Shashidhara KS, Rani Usha SD, Vinitha N, Ananda S, Shobha G: Biodiesel production from simarouba deoiled cake by transesterification and phytochemical analysis. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences* (7):2321–3272, 2017.
- Sheldon RA, van Pelt S: Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews* 42(15):6223–6235, 2013.
- Sheldon RA: Metrics of green chemistry and sustainability: past, present, and future. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 6(1):32–48, 2018.
- Sheldon RA: The E factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability. *Green Chemistry* 19(1):18–43, 2017.

- Shi L: Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 92:37–48, 2016.
- Shu ZY, Jiang H, Lin RF, Jiang YM, Lin L, Huang JZ: Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62(1):1–8, 2010.
- Silano M, Silano V: Food and feed chemical contaminants in the European Union: Regulatory, scientific, and technical issues concerning chemical contaminants occurrence, risk assessment, and risk management in the European Union. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(10):2162–2217, 2017.
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK: Microbial enzymes: industrial progress in 21<sup>st</sup> century. 3 *Biotech* 6(2):1–15, 2016.
- Singh R, Langyan S, Sangwan S, Rohtagi B, Khandelwal A, Shrivastava M: Protein for human consumption from oilseed cakes: a review. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 101, 2022.
- Singh S, Madlala AM, Prior BA: *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews* 27(1):3–16, 2003.
- Singh S, Pillay B, Dilsook V, Prior BA: Production and properties of hemicellulases by a *Thermomyces lanuginosus* strain. *Journal of Applied Microbiology* 88(6):975–982, 2000.
- Singhania RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A: Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44(1):13–18, 2009.
- Skjold-Jørgensen J, Vind J, Svendsen A, Bjerrum MJ: Altering the activation mechanism in *Thermomyces lanuginosus* lipase. *Biochemistry* 53(25):4152–4160, 2014.
- Song BD, Ding H, Wang SC: Hydrolysis of olive oil catalyzed by surfactant-coated *Candida rugosa* lipase in a hollow fiber membrane reactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12:121–124, 2007.
- Song Y, Li J, Hu X, Ni Y, Li Q: Structural characterization of a polysaccharide isolated from Lady Godiva pumpkins (*Cucurbita pepo lady godiva*). *Macromolecular Research* 19:1172–1178, 2011.
- Sose MT, Bansode SR, Rathod VK: Solvent free lipase catalyzed synthesis of butyl caprylate. *Journal of Chemical Sciences* 129(11):1755–1760, 2017.
- Sousa D, Salgado JM, Cambra-López M, Dias A, Belo I: Biotechnological valorization of oilseed cakes: Substrate optimization by simplex centroid mixture design and scale-up to tray bioreactor. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 17(1):121–134, 2023.
- Sreelatha B, Rao VK, Kumar RR, Girisham S, Reddy SM: Culture conditions for the production of thermostable lipase by *Thermomyces lanuginosus*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* 6(1):87–95, 2017.
- Stevenson DE, Wibisono R, Jensen DJ, Stanley RA, Cooney JM: Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®). *Enzyme and Microbial Technology* 39(6):1236–1241, 2006.
- Suárez-Escobedo L, Gotor-Fernández V: Solvent role in the lipase-catalysed esterification of cinnamic acid and derivatives. Optimisation of the biotransformation conditions. *Tetrahedron* 81:131873, 2021.

- Suganthi R, Benazir JF, Santhi R, Ramesh Kumar V, Hari A, Meenakshi N, ... Lakshmi R: Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. *International Journal of Engineering Science and Technology* 3(2):1756–1763, 2011.
- Sun C, Chen Y, Zhang H, Zhu L, Li X, Liang S: Preparation of glycerides enriched with n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids by *Thermomyces lanuginosus* lipase-catalyzed hydrolysis of tuna oil. *LWT* 114875, 2023.
- Świątek K, Gaag S, Klier A, Kruse A, Sauer J, Steinbach D: Acid hydrolysis of lignocellulosic biomass: Sugars and furfurals formation. *Catalysts* 10(4):437, 2020.
- Šelo G, Planinić M, Tišma M, Grgić J, Perković G, Koceva Komlenić D, Bucić-Kojić A: A comparative study of the influence of various fungal-based pretreatments of grape pomace on phenolic compounds recovery. *Foods* 11(11):1665, 2022.
- Šelo G, Planinić M, Tišma M, Martinović J, Perković G, Bucić-Kojić A: Bioconversion of grape pomace with *Rhizopus oryzae* under solid-state conditions: Changes in the chemical composition and profile of phenolic compounds. *Microorganisms* 11(4):956, 2023.
- Šelo G, Planinić M, Tišma M, Tomas S, Koceva Komlenić D, Bucić-Kojić A: A comprehensive review on valorization of agro-food industrial residues by solid-state fermentation. *Foods* 10(5):927, 2021.
- Takkellapati S, Li T, Gonzalez MA: An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery. *Clean Technologies and Environmental Policy* 20:1615–1630, 2018.
- Tan CH, Show PL, Ooi CW, Ng EP, Lan JCW, Ling TC: Novel lipase purification methods—a review of the latest developments. *Biotechnology Journal* 10(1):31–44, 2015.
- Tarasiuk A, Świerczyński M, Salaga M: Vegetable oils and oilseeds. *U Natural Plant Products in Inflammatory Bowel Diseases*. Academic Press, 215–237, 2023.
- Tarley CRT, Silveira G, dos Santos WNL, Matos GD, da Silva EGP, Bezerra MA, ... Ferreira SLC: Chemometric tools in electroanalytical chemistry: methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal* 92(1):58–67, 2009.
- Tesfaw AA, Tizazu BZ: Reducing sugar production from *Teff* straw biomass using dilute sulfuric acid hydrolysis: Characterization and optimization using response surface methodology. *International Journal of Biomaterials* 2021:2857764, 2021.
- Thakur SA, Nemade SN, Sharanappa A: Solid state fermentation of overheated soybean meal (Waste) for production of protease using *Aspergillus oryzae*. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* 4:18456–18461, 2015.
- Thomson R, Kwong P, Ahmad E, Nigam KDP: Clean syngas from small commercial biomass gasifiers; a review of gasifier development, recent advances and performance evaluation. *International Journal of Hydrogen Energy* 45(41):21087–21111, 2020.
- Thormann L, Neuling U, Kaltschmitt M: Opportunities and challenges of the European green deal for the chemical industry: An approach measuring innovations in bioeconomy. *Resources* 10(9):91, 2021.
- Tišma M, Tadić T, Budžaki S, Ostojčić M, Šalić A, Zelić B, Tran NN, Ngothai Y, Hessel V: Lipase production by solid-state cultivation of *Thermomyces lanuginosus* on by-products from cold-pressing oil production. *Processes* 7(7):465, 2019.

- Tsouko E, Kachrimanidou V, Dos Santos AF, do Nascimento Vitorino Lima ME, Papanikolaou S, de Castro AM, ... Koutinas AA: Valorization of by-products from palm oil mills for the production of generic fermentation media for microbial oil synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181:1241–1256, 2017.
- Tu WC, Hallett JP: Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 20:11–17, 2019.
- Ubando AT, Felix CB, Chen W-H: Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. *Bioresource Technology* 122585, 2019.
- Ullah K, Ahmad M, Sharma VK, Lu P, Harvey A, Zafar M, Sultana S: Assessing the potential of algal biomass opportunities for bioenergy industry: a review. *Fuel* 143:414–423, 2015.
- USDA: World agricultural supply and demand Estimates: WASDE – 637. Washington, DC: USDA, 2023. <http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/>. [4.7.2023.]
- Usha KY, Praveen K, Reddy BR: Enhanced production of ligninolytic enzymes by a mushroom *Stereum ostrea*. *Biotechnology Research International* 2014(2):815495, 2014.
- Vaidya AA, Murton KD, Smith DA, Dedual G: A review on organosolv pretreatment of softwood with a focus on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biomass Conversion and Biorefinery* 12(11):5427–5442, 2022.
- Van Pelt S, Teeuwen RLM, Janssen MHA, Sheldon RA, Dunn PJ, Howard RM, ... Wong JW: *Pseudomonas stutzeri* lipase: a useful biocatalyst for aminolysis reactions. *Green Chemistry* 13(7):1791–1798, 2011.
- van Putten RJ, Van Der Waal JC, De Jong ED, Rasrendra CB, Heeres HJ, de Vries JG: Hydroxymethylfurfural, a versatile platform chemical made from renewable resources. *Chemical Reviews* 113(3):1499–1597, 2013.
- Vandenbergh LP, Karp SG, de Oliveira PZ, de Carvalho JC, Rodrigues C, Soccol CR: Solid-state fermentation for the production of organic acids. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* 415-434, Elsevier, 2018.
- Vandenbergh LP, Pandey A, Carvalho JC, Letti LA, Woiciechowski AL, Karp SG, ... Soccol CR: Solid-state fermentation technology and innovation for the production of agricultural and animal feed bioproducts. *Systems Microbiology and Biomanufacturing* 1:142–165, 2021.
- Vauris A, Valcauda S, Husson F, De Coninck J: A novel method to assess heat transfer and impact of relevant physicochemical parameters for the scaling up of solid state fermentation systems. *Biotechnology Reports* 36:e00764, 2022.
- Vázquez-de-Aldana BR, Cuesta MJ, Zabalgoceazcoa I: Cultivation and growth dynamics of endophytic fungi in a solid culture medium based on sugar beet pulp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100(1):441–446, 2020.
- Veliöğlu Z, Ürek RÖ: Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems. *Turkish Journal of Biology* 39(1):160–166, 2015.
- Wang G, Liu C, Hong J, Ma Y, Zhang K, Huang X, ... Zhang M: Comparison of process configurations for ethanol production from acid-and alkali-pretreated corncob by *Saccharomyces cerevisiae* strains with and without  $\beta$ -glucosidase expression. *Bioresource Technology* 142:154–161, 2013.
- Wang H, Andersen KK, Sehgal P, Hagedorn J, Westh P, Borch K, Otzen DE: pH regulation of the kinetic stability of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Biochemistry* 52(1):264–276, 2013.



- Wang S, Xu Y, Yu XW: Micro-aqueous organic system: A neglected model in computational lipase design?. *Biomolecules* 11(6):848, 2021.
- Wang Y, Xin J, Shi J, Wu W, Xia C: A kinetic study of starch palmitate synthesis by immobilized lipase-catalyzed esterification in solvent free system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 101:73–79, 2014.
- Weerasooriya PRD, Chee WP, Haafiz MM, Hossain MS, Hussin MH: Isolation and characterization of hemicellulose blended carboxymethylcellulose films incorporated with lithium perchlorate as a potential ion conductive biopolymer. *Materials Letters* 299:130085, 2021.
- Williamson EM, Liu X, Izzo AA: Trends in use, pharmacology, and clinical applications of emerging herbal nutraceuticals. *British Journal of Pharmacology* 177(6):1227–1240, 2020.
- Wingfield PT: Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science* 84(1):A–3F, 2016.
- Xie X-L, Wei Y, Song Y-Y, Pan G-M, Chen L-N, Wang G, Zhang S-H: Genetic analysis of four sexual differentiation process proteins (isp4/SDPs) in *Chaetomium thermophilum* and *Thermomyces lanuginosus* reveals their distinct roles in development. *Frontiers in Microbiology* 10:2994, 2020.
- Yafetto L: Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon* 8(3):e09173, 2022.
- Yang G, Hou LL, Zhang FL: Study on the solid-state fermentation conditions for producing thermostable xylanase feed in a pressure pulsation bioreactor. U *Advanced Materials Research*, Trans Tech Publications Ltd., 236:72–76, 2011.
- Yang J, Ma X, Zhang Z, Chen B, Li S, Wang G: Lipase immobilized by modification-coupled and adsorption–cross-linking methods: A comparative study. *Biotechnology Advances* 28(5):644–650, 2010.
- Yang W, He Y, Xu L, Zhang H, Yan Y: A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 126:76–89, 2016.
- Yang XY, Zhang JX, Ding QY, He ZC, Zhu CY, Zhang KQ, Niu XM: Metabolites from two dominant thermophilic fungal species *Thermomyces lanuginosus* and *Scytalidium thermophilum*. *Chemistry & Biodiversity* 17(5):e2000137, 2020.
- Yasothei R: Chemical composition of sesame oil cake–review. *International Journal of Environmental Science and Technology* 3:827–835, 2014.
- Yesmin MN, Azad MAK, Kamruzzaman M, Uddin MN: Bioethanol production from corn, pumpkin and carrot of bangladesh as renewable source using yeast. *Acta Chemica Malaysia* 4(2):45–54, 2020.
- Yoo CG, Meng X, Pu Y, Ragauskas AJ: The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review. *Bioresource Technology* 301:122784, 2020.
- Yousuf A, Pirozzi D, Sannino F: Fundamentals of lignocellulosic biomass. U *Lignocellulosic Biomass To Liquid Biofuels*, Academic Press, 1–15, 2020.

- Zamani A, Jeihanipour A, Edebo L, Niklasson C, Taherzadeh MJ: Determination of glucosamine and *N*-acetyl glucosamine in fungal cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(18):8314–8318, 2008.
- Zanelato AI, Shiota VM, Gomes E, Silva RD, Thoméo JC: Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. i-1d3b in a packed bed solid state fermentor. *Brazilian Journal of Microbiology* 43:1536–1544, 2012.
- Zeng W, Chen HZ: Air pressure pulsation solid state fermentation of feruloyl esterase by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 100(3):1371–1375, 2009.
- Zhai SS, Zhou T, Li MM, Zhu YW, Li MC, Feng PS, ... Yang L: Fermentation of flaxseed cake increases its nutritional value and utilization in ducklings. *Poultry Science* 98(11):5636–5647, 2019.
- Zhang Y, Cremer PS: Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology* 10(6):658–663, 2006.
- Zhang Y, Pitkänen L, Douglade J, Tenkanen M, Remond C, Joly C: Wheat bran arabinoxylans: Chemical structure and film properties of three isolated fractions. *Carbohydrate Polymers* 86(2):852–859, 2011.
- Zhang Y, Wang L, Chen H: Correlations of medium physical properties and process performance in solid-state fermentation. *Chemical Engineering Science* 165:65–73, 2017.
- Zhao T, Yan X, Sun L, Yang T, Hu X, He Z, ... Liu X: Research progress on extraction, biological activities and delivery systems of natural astaxanthin. *Trends in Food Science & Technology* 91:354–361, 2019.
- Zheng YY, Guo XH, Song NN, Li DC: Thermophilic lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Gene cloning, expression and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 69(3-4):127–132, 2011.
- Zhou Z, Liu D, Zhao X: Conversion of lignocellulose to biofuels and chemicals via sugar platform: an updated review on chemistry and mechanisms of acid hydrolysis of lignocellulose. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 146:111169, 2021.